

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

З. Э. БЕККЕР

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГРИБОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1988

Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 230 с. — ISBN 5—211—00132—X.

В монографии изложены новые данные по составу и строению грибной клетки, минеральному, углеродному и азотному обмену, ферментам и витаминам в клетках грибов. Практическая ценность книги обусловлена наличием в ней большого материала прикладного характера, отражающего биотехнологические аспекты использования грибов как продуцентов лекарственных препаратов, витаминов и ферментов.

Книга предназначена для широкого круга микробиологов, микологов, медиков; может быть рекомендована в качестве учебного и справочного пособия для студентов и аспирантов университетов и фармакологических отделений медицинских вузов.

Табл. 56. Ил. 81. Библиогр.: 335 назв.

Научный редактор кандидат биологических наук З. А. Туркова

Рецензенты: доктор биологических наук, профессор И. С. Кулаев;
член-корреспондент АН СССР профессор Л. Н. Андреев

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
Московского университета*

2003000000—140
Б $\frac{\quad}{077(02)—88}$ 132—88

ISBN 5—211—00132—X

© Издательство Московского
университета, 1988



ОБ АВТОРЕ

Автор предлагаемого издания — доктор биологических наук, профессор Зинаида Эрнестовна Беккер (1908—1986) была выдающимся специалистом в области изучения грибов, ученым, известным как в нашей стране, так и за рубежом. Круг ее микологических исследований обширен. Проведенные и опубликованные З. Э. Беккер работы свидетельствуют о широте научных интересов и большой эрудиции. Она занималась морфологией, цитологией, физиологией и биохимией грибов. Верность объекту исследований дала ей возможность внести видный вклад в учение о грибах.

З. Э. Беккер была ученицей известного миколога профессора Л. И. Курсанова, которого почитала всю жизнь и памяти его посвятила свою книгу «Физиология грибов» (1963) и ряд других работ.

Зинаида Эрнестовна работала во многих областях прикладной микологии и постоянно развивала фундаментальные аспекты знаний о грибах. Ею внесен значительный вклад в организацию антибиотической промышленности и производство пенициллина в нашей стране. Около 20 лет, с 40-х по 60-е гг., она возглавляла лабораторию новых антибиотиков грибного происхождения во Всесоюзном научно-исследовательском институте антибиотиков, где сейчас успешно работают ее ученики.

В 60—70 гг. З. Э. Беккер руководила лабораторией физиологии и биохимии грибов Института ботаники АН Туркменской ССР, где было создано новое направление комплексного подхода к борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника, включающего широкие эколого-физиологические исследования.

Многие годы Зинаида Эрнестовна была связана с Московским университетом. Она подготовила около 80 студентов-дипломников и несколько десятков аспирантов, которые теперь работают во многих республиках нашей страны, а также в Болгарии, Чехословакии, ГДР.

Последние 30 лет Зинаида Эрнестовна читала курс физиологии грибов на кафедре низших растений биологического факультета МГУ. Цикл ее лекций давал углубленные знания по физиологии и биохимии грибов и постоянно пополнялся новыми последними литературными данными, а также результатами собственных исследований. Лекции З. Э. Беккер привлекали не только студентов и аспирантов, но и специалистов разных областей микологической науки.

Книга З. Э. Беккер будет интересна и полезна микологам, работающим в различных направлениях фундаментальной и прикладной микологии, биохимикам, физиологам растений, фитопатоологам и другим научным работникам. Аспиранты и студенты могут использовать книгу как справочное и учебное пособие.

Член-корр. АН СССР,
проф. М. В. Горленко

Данная книга является итогом почти тридцатилетней научной и педагогической работы ее автора на биологическом факультете Московского университета.

Необходимость в такого рода обобщении знаний в области физиологии и биохимии грибов возникла давно и по нескольким причинам.

Во-первых, выделение грибов в отдельное царство в системе природы привело к их более широкому изучению с позиций новых, помимо таксономии, экологии и морфологии, дисциплин, включающих физиологию, биохимию, биофизику, молекулярную биологию и биоорганическую химию.

Широко обобщающих материалов по физиологии, биохимии и другим подобным направлениям в микологической литературе вышло за последние 20—30 лет далеко не достаточно и это является второй из главных причин, определяющих высокую потребность в такого рода монографиях.

Еще одна причина, побуждающая к опубликованию материала, собранного в данной книге, состоит в необходимости популяризации трудов русских и советских ученых, так незаслуженно редко цитируемых в зарубежных научных публикациях.

Четвертая причина, которую всегда выдвигал на должное место учитель автора Л. И. Курсанов (см. предисловие к книге: Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. М., 1953) состоит в потребности практики в подобных знаниях, в частности чрезвычайно разросшихся в последние 20 лет промышленных методов получения с помощью грибов очень многих продуктов их жизнедеятельности, важных для пищевой промышленности, сельского хозяйства и медицины, таких как белки, аминокислоты, витамины, ростовые вещества растений, ферменты, антибиотики и другие биологически активные вещества, необходимые в медицине и ветеринарии.

Еще одна особенность книги заключается в том, что, как и в случае предшествующей, изданной в 1963 г. (Физиология грибов и их практическое использование. М.), автор ее старалась не ограничиваться рассмотрением материала с чисто физиолого-биохимических позиций, как это часто принято в подобных трудах, а связывать его с другими подходами и материалами микологической науки: морфология и цитоморфология онтогенеза, эволюционная морфология, таксономия и экология.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АДФ — аденозиндифосфат
АМФ — аденозинмонофосфат
АТФ — аденозинтрифосфат
ГБ — глицериновое брожение
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГК — глюкуронат-ксилозузный путь гликолиза
ГКБ — глюконово-кислое брожение
ГМФ — путь метаболизма углеводов через гексозомонофосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА — диоксифенилаланин
ДФГ-ПФК — дифосфоглицерат-полифосфаткиназа
ДФГ-ПФТ — дифосфоглицерат-полифосфаттрансфераза
ИМФ — инозинмонофосфат
И-РНК — информационная РНК
ИРФ — инозинрибофосфат
ИУК — индолилуксусная кислота
ИЭТ — изoeлектрическая точка
KOA-SH-коэнзим А
МКБ — молочно-кислое брожение
НАД — никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН — никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановлен
ПАБ — парааминобензойная кислота
ПГ — полигалактуроназа
ПМЭ — пектинметилэстераза
ПТЭ — пектинтрансэлиминаза
ПФ — полифосфат
ПФ-АМФ-ФТ — полифосфат-АМФ-фосфотрансфераза
ПФГ — полифосфат-фосфогидролаза
ПФГК — полифосфатглюкокиназа
ПФД — полифосфатдеполимераза
ПФК — полифосфаткиназа
ПФФК — полифосфатфруктокиназа
РНК — рибонуклеиновая кислота
СБ — спиртовое брожение
СД — синтез дезоксирибозы
СР — синтез рибозы
СС — синтез седогептулозы
ТКК — цикл трикарбоновых кислот Кребса
ТТФА — теонилтрифторацетат
ТПФ — тиаминпирофосфат
УДФ — уридиндифосфат
УДФАГ — уридиндифосфатацетилглюкозамин
УДФГ — уридиндифосфатглюкоза
УМФ — уридинмонофосфат
ФАД — флавинадениндинуклеотид
ФМН — флавинаденинмононуклеотид
ФМНН — флавинаденинмононуклеотид восстановленный
ЦТФ — цитозинтрифосфат

ЭД — путь метаболизма глюкозы Энтнера—Дудорова
ЭМП — путь метаболизма глюкозы Эмбдена—Мейергофа—Парнаса
CL — кардиолипин
PC — фосфатидилхолин
PE — фосфатидилэтаноламин
PI — фосфатидилинозит
PP_в — пиррофосфат неорганический
PS — фосфатидилсерин
SAM — S-аденозилметионин

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ И ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Грибы представляют собой очень своеобразную группу организмов. Они являются эукариотами, т. е. имеют принципиально отличающее их от других микроорганизмов настоящее ядро, а не нуклеоид, как у сине-зеленых водорослей, бактерий и актиномицетов, с которыми их сближает осмотический и гетеротрофный тип питания. С другой стороны, хотя среди лексикона микологов весьма распространены такие термины, как «микофлора» или «сапрофит», подразумевающие отнесение грибов к царству растений, их принципиально отличает от растений не только неспособность к фотосинтетическому усвоению углекислоты, но и многочисленные особенности их онтогенеза, ядерных циклов и продуктов обмена веществ, которые нередко носят черты, свойственные животным: насекомым, ракообразным, моллюскам и червям. Если позволительно так выразиться, они носят черты животных с осмотическим питанием и отсутствием нервной системы.

Все это дало основания большинству микологов встать на точку зрения, что грибы представляют собой совершенно особое, четвертое царство природы, обособившееся от других царств растений, животных и микроорганизмов, на очень древнем этапе становления жизни на Земле.

Важнейшими основаниями для такого заключения послужили не только форма, структура и жизненные циклы, но и особенности химического состава клеток грибного мицелия и продуктов их обмена (Тезисы докладов IV Секции XII Международного Ботанического Конгресса. 1975. Т. 1. Л.).

Физиолого-биохимическое исследование на живых организмах, как правило, должно базироваться на изучении их чистых культур, растущих в лабораторных условиях, что весьма часто осложняется трудностью подбора оптимальных условий для их культивирования, в частности выбором композиции питательных сред. Однако в любом случае компоновки среды, оптимальной для роста и жизнедеятельности изучаемого организма, весьма большую помощь в отношении подбора ее компонентов и их количественных соотношений оказывает знание химического состава клеток данного организма. При этом важен как их элементарный состав, характеризующий преобладающие пути обмена (азотный, углеродный, фосфорный и т. д.), так и специфические продукты этого обмена, входящие в состав клеточных структур.

1. Содержание воды и сухих веществ

В мясистых плодовых телах грибов и в их мицелии количество сухого вещества не превышает 10—20% и во многих из них доля воды составляет свыше 90%. Количество ее меняется в зависимости от возраста плодового тела гриба и наличия доступной влаги, включая и влажность воздуха (Рипачек, 1967). Например, у *Ganoderma applanatum* молодые плодовые тела содержат воды 93%, старые — 81%, плодовые тела из сухой местности — 74%, а споры 20% и менее.

В структурах, предназначенных для сохранения вида в неблагоприятных условиях, в частности при высушивании таких, как склеротии или споры, доля воды много меньше и не превышает 10—20%. В многолетних кожистых и деревянистых плодовых телах грибов количество воды обычно достигает свыше 50%.

В элементарном составе грибов очень типичной является большая доля азота, составляющая порядка 7—8% от массы сухого мицелия. Доля углерода и кислорода составляет в нем порядка 40% каждого, водорода — 2—3%, а зольных элементов — около 7—8% от общей массы сухого вещества. Распределение долей от массы сухого мицелия, приходящихся на главные группы органических соединений, приведено в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Состав плодового тела, спор и мицелия грибов в % от массы сухого мицелия

Органические соединения	Плодовое тело	Споры	Мицелий
Вода	91	17	—
Масса сухого мицелия	9	83	—
Азотистые вещества (белки)	41	27	12
Жиры	1—2	1	34
Гликоген и др. полисахариды	31	21	45
Маннит	6	—	—
Сахара	5	0,7	—
Лецитин	—	1,6	—
Эргостерин	—	0,1	—
Вещества оболочки (хитин)	6—7	13,5	5,5
Зола	7,5	6,5	—
Фосфор золы (от массы всей золы)	25	66,05	—
Литература	Курсанов, 1940	Фостер, 1950	Smithies, 1952

Сходный состав имеет мицелий продуцента пенициллина *Penicillium chrysogenum*, получаемый по окончании ферментации пенициллина (табл. 1.2), только золы в нем оказывается несколько больше (порядка 11—12%), что, видимо, зависит от особенностей сильно нагруженной элементами питания ферментационной среды.

Таблица 1.2

Состав мицелия *Penicillium chrysogenum* из производственной ферментации для получения пенициллина (Iapick, Skupin, 1958)

Вещество	Содержание, %
Общий азот	5,81—6,05
Белок	36,31—37,81
Сахара	0,46—0,85
Жир	4,18
Лецитин (в миллиграмм-процентах)	86,7—93,7
Зола	10,8—12,05

С другой стороны, у форм, обитающих в природе на растительных субстратах, а не на почве, как продуцент пенициллина, например у дереворазрушающих грибов, количество золы оказывается много меньше, не превышая 3—5% (Рипачек, 1967).

2. Клеточная оболочка грибов

Довольно большую долю массы сухого мицелия грибов составляет их клеточная стенка, а именно от 5 до 15%. Состав ее сильно варьирует и часто весьма специфичен для определенных таксономических групп грибов. Это можно видеть из примеров ее состава у представителей дрожжей, хитридиевых и муковых грибов — зигомизетов, приведенного в табл. 1.3 (Aronson, 1965).

Таблица 1.3

Химический состав клеточной стенки грибов в % от сухого веса их оболочки (Aronson, 1965)

Составные части	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (пекарские дрожжи)	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Mucor rouxii</i> (мицелиальная форма)
Азот	2,1	5,5	—
Фосфат	0,31	—	23,3
Липоиды	8,5	—	7,8
Протеин	13,5	16,0	6,3
Хитин	1,0	58,0	9,4
Хитозан	—	—	32,7
Глюкан	28,8	16,0	—
Маннан	31,0	—	3,8
Другие углеводы	—	—	9,5
Зола	—	8,0	2,0*
Литература	Northcote, Horne, 1952	Aronson, Machlis, 1959	Bartnicki-Garcia, Nickerson, 1965

* Количество золы без фосфатов.

Структурно оболочки грибов построены на основе двухфазной системы, в которой имеются микрофибриллы, включенные в аморфную массу матрикса. По данным электронной микроскопии, она состоит не менее чем из двух слоев с различно направленной ориентацией фибрилл. Внутренний слой обычно ориентирован по главной оси клетки, наружные — под углом к ней (рис. 1.1).

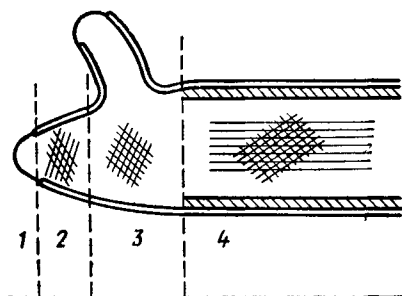


Рис. 1.1. Строение и развитие клеточной стенки грибов: 1 — ненапряженная зона кончика гифы; 2 — зона образования поперечных фибрилл методом интуссусцепции, проникновение микрофибрилл; 3 — область продольного растяжения фибрилл (область расслабления); 4 — область формирования внутреннего слоя жестких продольных фибрилл (область ригидификации и прекращения развития наружной сети фибрилл) (Burnett, 1968)

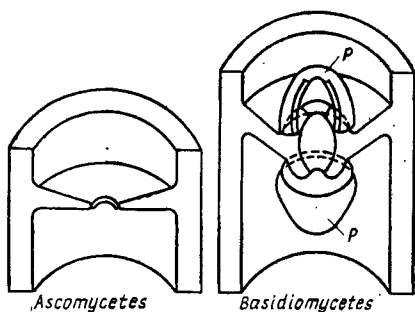


Рис. 1.2. Строение пор в клеточных перегородках вегетативных сумчатых и базидиальных грибов: P — парентосома (Moore, 1965)

У дрожжей оболочка обычно многослойная, причем в наружном толстом слое локализован маннан, во внутреннем тонком — глюкан. У водных грибов, например у *Allomyces*, оболочка образует ложные перегородки — псевдосепты, напоминающие спицы колеса. У сумчатых и базидиальных грибов наблюдаются настоящие перегородки — септы. У сумчатых септы между клетками обычно имеют одну простую пору, по обе стороны которой в процессе ее формирования можно видеть по паре осмофильных телец Воронина. У базидиальных грибов эти поры нередко бывают очень сложными, снабженными колпачками — парентосомами (рис. 1.2). Такие поры были найдены в плодовых телах и ризоморфах ряда высших базидиомицетов (Moore, 1965; Burnett, 1968). Однако до настоящего времени остается не вполне ясным, относить ли это различие в структуре септальных пор аско- и базидиомицетов к их таксономической принадлежности или к гаплоидной и гомокариотической структуре генома сумчатых и к ди- и гетерокариотической природе базидиальных грибов. Таких исследований пока еще нет, но их

значение для эволюционных и таксономических построений в царстве грибов весьма принципиальное.

Много нового добавили к изучению септальных пор грибов исследования на электронно-микроскопическом уровне (Flegler et al., 1976; Камалетдинова, Васильев, 1982). Во-первых, стало известно, что долипоры базидиальных грибов являются структурами, видимо, герметически изолирующими клетки мицелия друг от друга вплоть до начала образования ими плодовых тел (Flegler et al., 1976). Эта изоляция осуществляется растворимыми протеолитическими ферментами и одновременно осмофильными (содержащими белки и липиды) двусторонними пробками, которые исчезают к моменту формирования плодовых тел. Их исчезновение сопровождается перфорациями парентосом и сообщение между клетками гиф восстанавливается.

Последние наблюдения над септами в плодовых телах дискомицетов (например, *Peziza badia* — Камалетдинова, Васильев, 1982) показали, что сходные разобщающие клетки гиф структуры существуют и у класса сумчатых грибов. В их формировании принимают участие тельца Воронина, образующиеся в колбообразных инвагинациях клеточной мембраны, осмофильное содержимое которых (тельце Воронина) высвобождается близ септы и располагается у отверстия септы, постепенно проникая в нее, создавая при этом замыкающее ее устройство. Дальнейшему проникновению тельца Воронина в вышележащий гимениальный слой, видимо, препятствует специальная перфорированная структура, лежащая над порой септы в материнской клетке будущей сумки, которая оказывается полностью изолированной от проникновения субмикроскопических органелл из субгимениального слоя. Подобные же изолирующие структуры наблюдаются и в формирующихся в плодовых телах парафизах.

Сходные структуры имеются и в спорулирующем мицелии несовершенных грибов, содержащих тельца Воронина, например у *Arthrotrichia conoides*. У продуцента пенициллина дейтеромицета *Penicillium chrysogenum* была обнаружена в септе структура, в точности соответствующая найденной Камалетдиновой и Васильевым у дискомицета *Peziza badia* (Kurilowich et al., 1980).

Скелетные основы оболочек грибов составлены кристаллически организованными полисахаридами: целлюлозой, хитином, хитозаном, маннаном, глюканами и другими. Все они имеют линейную структуру с β -1,4-связями исходных компонентов — мономеров гексоз, amino- и ацетаминогексоз. По результатам микрохимического тестирования (окраска рутением красным) ранее считалось, что в составе клеточных оболочек грибов имеется пектин. Однако результаты химического анализа не подтвердили в ее составе входящего в структуру пектина мономера галактуроновой кислоты (Aronson, 1965).

Хитин и хитозан для большей части грибов очень характерны в составе их оболочек как азотсодержащие полимеры. При этом хитин грибов очень сходен с хитином насекомых и ракообразных,

что было подтверждено картиной их дифракции в рентгеновских лучах. Однако азота в хитине грибов меньше, чем у животных, и среди его составных частей была обнаружена метилпентоза, называемая мицетозой. Хитин у грибов удается обнаружить микрохимически по методу Ван Висселинга, с помощью частичного щелочного деацетилирования и последующей реакцией на хитозан и по дифракции X-лучей. Он не был найден только у оомицетов, таких, как сапролегниевые и пероноспорные грибы. Ранее считалось, что хитин отсутствует у дрожжей, однако он содержится в клеточных перегородках — септах сахаромицетов (Кулаев, 1975).

В настоящее время установлено, что хитин можно обнаружить у *Chitrydiales*, *Monoblepharidales*, *Protomycetales*, *Hyphochytridiales*, у всех *Endomycetales*, *Blastocladales*, *Mucorales*, *Entomophthorales*, у всех сумчатых и базидиальных грибов и происходящих от них *Fungi imperfecti* (дейтеромицетов). Исключение составляют *Oomycetes*, у которых из полисахаридов в оболочке присутствует целлюлоза, полностью отсутствующая у представителей дрожжевых грибов.

В течение последнего времени в связи с выявлением возможности практического использования хитина грибов для синтеза полимеров появилось довольно много исследований с данными по более тонкому изучению его в сопоставлении с хитином ракообразных (табл. 1.4). Ацетата и D-глюкозамина меньше всего

Таблица 1.4

Физико-химические свойства образцов хитина микроскопических грибов и панциря краба (% от массы образца) (Феофилэва и др., 1980)

Образец	Содержание, %			Содержание, %			
	азот	углерод	водород	ацетат	D-глюкозамин	Пентоза	Общие сахара
N-ацетил-D-глюкозамин (из лаборатории химического завода)	6,035	43,40	6,99	29,8	69,0	0,54	0,59
Хитин краба <i>Cancer magister</i>	6,37	43,74	6,87	36,8	66,4	0,76	0,43
Хитин <i>Aspergillus niger</i>	4,99	43,77	6,44	24,2	51,7	1,75	4,65
Хитин <i>Cunninghamella japonica</i>	5,43	42,75	6,72	31,0	69,2	0,94	0,83
Хитин <i>Blakeslea (Choanephora) trispora</i>	5,88	42,17	6,44	26,4	63,3	0,96	0,91
Теоретически вычисленное содержание элементов в хитине	6,40	43,80	5,44				

у *Aspergillus niger*, что объясняется более высоким содержанием пентоз и глюкозы в составе β-глюкана и двух α-глюканов оболочки гриба. Анализ дифрактограмм показал идентичную кристаллическую структуру хитина грибов и крабов с несколько большей упорядоченностью у последних. Кроме того, хитин грибов в противоположность пластинчатой структуре хитина крабов имел волокнистое строение (Феофилова и др., 1980).

Заменяющий хитин у некоторых муконовых грибов хитозан, обнаруживаемый при слабом кислотном гидролизе реакцией на

хитозансульфат, найден, кроме *Mucor rouxii*, также у *Phycomyces blakesleeianus*. Количество ацетильных групп в нем оказалось различным и варьировало у *M. rouxii* до нуля. Из других аминополисахаридов полимер галактозамина со свободной аминогруппой, способной связывать фосфаты, со структурой типа хитозана, был выделен из клеточных оболочек *Neurospora crassa*, *N. sitophilla*, *A. niger* и *Botrytis cinerea* (Aronson, 1965). У ряда грибов встречаются полимеры из аминосахаров, ассоциированных с маннаном, глюканом и протеинами.

Целлюлоза в клеточных оболочках грибов обычно не встречается одновременно с хитином. Исключение составляет один *Rhizidiomyces* из порядка гиφοхитридиевых грибов, у которого они были обнаружены одновременно. Целлюлоза была обнаружена у грибов из оомицетов порядков *Acrasiales*, *Lagenidiales*, *Saprolegniales*, *Leptomitales*, *Peronosporales* (Aronson, 1965).

Среди грибов, обитающих в водной среде, целлюлоза встречается обычно только в группах, имеющих двужгутиковые зооспоры. У *Blastocladales* и *Monoblepharidales*, имеющих одножгутиковые зооспоры, ее нет. Исключение, которое составляет *Rhizidiomyces* из порядка *Hyphochytridiales*, имеющий одновременно и хитин, и целлюлозу и считающийся по Нейбл переходной формой между имеющими хитин *Chytridiales* и *Blastocladales* и содержащими целлюлозу оомицетами, объяснимо. Эта одножгутиковая форма имеет жгутик зооспор перистый, а не бичеподобный, как у *Blastocladales* и *Monoblepharidales*. Любопытно, что строение ворсинок перистых жгутиков оомицетов напоминает строение жгутиков бактерий, тогда как бичеподобные полностью схожи со жгутиками флагеллат.

Целлюлоза у грибов легко обнаруживается микрохимически реактивом Швейцера или реактивом, состоящим из раствора йода в йодистом калии с добавлением 70%-го раствора серной кислоты.

Глюканы у грибов очень обильны и отличаются от целлюлозы по их структуре. Мономеры их также представляют собой глюкозу. Однако наиболее изученные глюканы дрожжей имеют менее кристаллические структуры, чем целлюлоза. Кристалличность глюканов увеличивается вследствие образования гидроглюканов при их обработке серной кислотой. Подобные глюканы, находящиеся в ассоциации с протеинами, были обнаружены у дрожжей и у *Penicillium notatum* (Aronson, 1965). Другой глюкан, входящий в состав оболочек грибов,— каллоза, сходная с обнаруживаемой в ситовидных трубках высших растений и сильно красящаяся основными красителями, т. е. имеющая кислую природу, в противоположность целлюлозе имеет β -1,3-глюкозидные связи. Подобный глюкан, красящийся основными красителями, был обнаружен у *Sclerotinia*. Глюканы имеются также у *Aspergillus fischeri*, *Allomyces macrogynus*, *Neurospora crassa*. У грибов встречаются также гетерополисахариды, составленные из мономеров различных сахаров, особенно частые у рода *Penicillium*. У дрожжеподобных форм, патогенных для животных, как у *Coccidioides* и *Cryptococcus*, по-

добные же, но кислые полисахариды входят в состав окружающих их клетки капсул. Примеры глюканов и других продуктов полимеризации моносахаров и сахарных кислот, входящих в состав оболочек клеток и запасных веществ грибов, приведены в табл. 1.5.

Таблица 1.5

Примеры полисахаридов грибов с расшифрованной структурой по Кокрейну (Cochrane, 1958)

Полисахарид	Продукты гидролиза	Организмы-продуценты
Гликоген	Глюкоза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Phymatotrichum omnivorum</i> и др.
Склеротиноза	»	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
Компактоза	»	<i>P. brevi-compactum</i>
Нигеран (микодекстран)	»	<i>A. niger</i>
Полиглюкоза	»	<i>Penicillium</i> sp.
Кислая полиглюкоза	»	<i>A. fischeri</i> , <i>P. charlesii</i>
Капсульная полиглюкоза	»	<i>P. luteum</i>
Лютениновая кислота	глюкоза, малоновая кислота	<i>Torulopsis</i> sp.
Варианоза	глюкоза, галактоза	<i>P. luteum</i>
Капреолиноза	глюкоза, манноза, галактоза, малоновая кислота	<i>P. varians</i> <i>P. capreolinum</i>
Полиуронид	глюкоза, галактуроновая кислота	<i>Coccidioides immitis</i>
Леван	фруктоза	<i>A. sidovi</i>
Полигалактоза	галактоза	<i>P. charlesii</i>
Ругулоза	»	<i>P. rugulosum</i>
Микогалактан	»	<i>A. niger</i>
Нейтральная полигалактоза	»	<i>P. luteum</i>
Галактокарлоза	»	<i>P. charlesii</i>
Манскарлоза	манноза	»
Капсульный полисахарид	ксилоза, манноза, глюкуроновая кислота	<i>Cryptococcus (Torulopsis) neoformans</i>
Капсульный полисахарид	ксилоза	<i>Torulopsis</i> sp.

Маннаны, полисахариды, составленные из мономеров маннозы. встречаются особенно обильно у дрожжей, причем они часты у видов дрожжей, обитающих на поверхности камбияльного стоя под корой деревьев. К числу таких форм относится обитающая под корой хвойных деревьев *Hansenula*; в окружающей клетки этих дрожжей капсуле полисахарид присутствует в форме фосфоманнана. Этот гидрофильный и слизистый полисахарид прилипает вместе с дрожжами к щетинкам, покрывающим тело жуков короедов, и таким путем дрожжи переносятся с их помощью с одного дерева на другое (Wickerham, Barton, 1961). У грибообразующих грибов маннаны пока обнаружены не были, но в гидролизатах их клеточных стенок встречается манноза.

У грибов встречаются также полисахариды, содержащие галактозу, 6-дезоксипентозу, метилпентозы, наиболее часто фруктозу, особенно у муковых. В оболочках клеток *Penicillium chrysogenum* были найдены из числа пентоз 6-дезоксипентоза, рамноза и ксилоза, которую обнаружили также у трутовика *Polystictus sanguineus*.

Полисахаридно-протеиновые комплексы были обнаружены у дрожжей, например у *Candida albicans* — возбудителя молочницы грудных детей. Маннано-протеиновый комплекс был найден у *Saccharomyces*.

Липиды у грибов количественно сильно варьируют в зависимости от условий окружающей среды и возраста культуры. Иногда их количество достигает 35—36% от массы сухого вещества клеток. У дрожжей более 3% липидов найдено в их оболочках. Обнаружены они и в оболочках муковых грибов, например у *Mucor rouxii* и *Phycomyces*, в спорангиеносцах которого установлено около 25% липидов от их сухой массы. Вероятно, они содержатся там в образованиях типа кутикулы (Aronson, 1965).

Пигменты также входят в заметных количествах в состав клеточных оболочек грибов. Пигменты, в особенности часто локализованный в виде особого слоя черный пигмент, меланин, очень часто встречаются в клеточных стенках мицелия или в оболочках спор многих грибов. Такой меланиновый слой имеется в оболочках аскоспор *Neurospora tetrasperma* (Aronson, 1965).

Меланин отсутствует у грибов с низкой активностью полифенолоксидазы, принимающей участие в его биосинтезе, и с преобладанием в обмене активных дегидрогеназ. Такие грибы, к которым относятся представители родов *Fusarium*, *Trichothecium*, *Arthrotrix*, *Cephalosporium* и многие другие, характеризуются чаще всего розовой или оранжевой окраской спорирующих структур, зависящей от обилия каротиноидов, принимающих на себя роль светозащитного экрана и антиоксиданта, принадлежащую у темноокрашенных грибов меланину. Связь наличия каротиноидов с высоким уровнем активности дегидрогеназ объясняется тем, что оптимальные условия окислительно-восстановительного режима для действия дегидрогеназ совпадают с условиями, оптимальными для биосинтеза каротиноидов и других продуктов шунта терпеноидов. Каротиноидные пигменты уже не входят обычно в состав клеточных оболочек грибов, а локализируются либо в клеточной мембране, либо в каплях липидов, рассредоточенных в цитоплазме. В отдельных случаях у грибов встречаются совершенно особые пигменты, как оомохромы, глазные пигменты насекомых, у трутовика *Russulporus* (*Polyporus*) *cinnabarinus* (Шиврина, 1965) или фикобилины у видов сыроежек *Russula emetica* и *R. paludosa* (Ефименко, 1972), входящие в систему фотосинтеза у сине-зеленых и красных водорослей.

3. Полифосфаты и ДНК в клетках грибов

Из встречающихся в больших количествах неорганических соединений в клеточных оболочках грибов, в частности в оболочках конидий *Neurospora*, найдено много полифосфатов, связывающих около 11% катионов оболочки и образующих в ней солеподобные соединения хитозанфосфаты. У дрожжей фосфаты связаны с глюкотеидами, и, кроме того, в их оболочках содержится немного нуклеиновых кислот.

Однако роль полифосфатов как высокоспециализированных макроэргов, организующих специфику энергоснабжения и питания грибов, не сводится только к участию в структуре клеточной оболочки и требует специального рассмотрения.

Прежде всего необходимо заметить, что полифосфаты грибов имеют прямое отношение к гранулам так называемого волютина, образующимся в их вакуолях при действии слабых оснований (например, сильно разбавленного аммиака) или основных красителей.

Волютин грибов имеет непостоянный состав в их онтогенезе, способен растворяться не только в кислотах, но и в слабо подщелоченных солях (например, в 0,1 М NH_4NO_3 , подщелоченном до pH 8,0 и в 2—2,5 М растворе аммиака) (Беккер, 1956). Его накопление согласуется с нарастанием солерастворимой фракции полифосфатов в процессе активного синтеза нуклеиновых кислот (Кулаев, 1975).

Использование цитохимических методов, таких как сравнительная фотосъемка в световом и ультрафиолетовом микроскопе, обработка сформированных волютиновых гранул рибонуклеазой, окраска их пиронином и толуидиновой синей после извлечения из них нейтрального красного этанолом (рис. 1.3) позволили уточнить их состав. В процессе онтогенеза продуцента пенициллина он менялся от состава чисто полифосфатной природы через промежуточные двуслойные структуры к чисто рибонуклеиновому (Дмитриева, Беккер, 1962). Согласно исследованиям Л. Н. Кац (1964), состав предсуществующего волютина изученного ею актиномицета менялся в диаметрально противоположном направлении — от РНК-волютина к полифосфатному. По всем этим данным можно с достаточными основаниями утверждать, что волютин грибов несхож с истинным предсуществующим волютином прокариотов, а скорее схож с криномом животных.

Что полифосфатный обмен грибов отличается от такового у актиномицетов и бактерий, можно видеть также и по синтезирующим и расщепляющим полифосфаты ферментам (Кулаев, 1975). Как видно из прилагаемой схемы (табл. 1.6), у грибов, бактерий и актиномицетов есть общие энзимы этого обмена, такие как полифосфат-фосфогидролаза (ПФГ), полифосфаткиназа (ПФК) и дифосфоглицерат-полифосфаттрансфераза (ДФГ-ПФТ).

Однако уже такой энзим, как ПФК, переносящий фосфат с АТФ на полифосфат и обратно с полифосфата на АДФ, действует в обоих направлениях только у *Eubacteria*, а у актиномицетов и

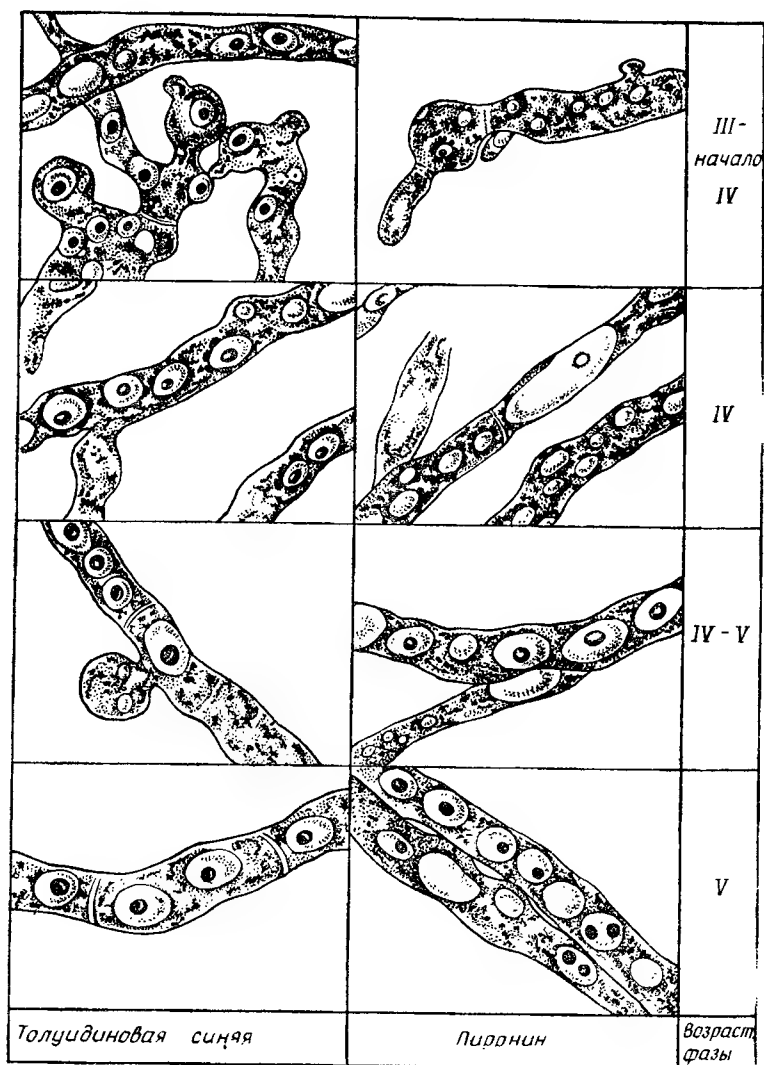


Рис. 1.3. Волутин, сформировавшийся в виде гранул после витальной окраски мицелия *Penicillium chrysogenum*, из погруженной культуры в его различных возрастных фазах. Обесцвеченные этанолом гранулы в III и в начале IV возрастных фазах окрашиваются в красноватый цвет толундинблау и не окрашиваются пиронином, т. е. содержат полифосфаты. Начиная с перехода мицелия в V возрастную фазу они окрашиваются пиронином и в синий цвет толундинблау, т. е. содержат РНК (Дмитриева, Беккер, 1962)

грибов только в одном и взаимопротивоположном. У грибов синтез полифосфатов за счет АТФ вообще не возможен.

У форм, причисляемых Н. А. Красильниковым (1970) к актиномицетам, имеются кроме этих еще три энзима: полифосфатглю-

Включение в метаболизм полифосфатов различных ферментов у бактерий, актиномицетов и грибов (Кулаев, 1975) (стрелками показано наличие ферментов в данной группе организмов)

Ферменты	<i>Pro-aryota</i>	<i>Eucaryota</i>
ПФД (оптимальный pH 3,2—3,4)		Fungi
ПФГК (оптимальный pH 7,4)		
ПФФК		
ПФ-АМФ-ФТ		
ПФК (оптимальный pH 7,2)		
ДФГ-ПФТ (оптимальный pH 7,2—7,4)		АДФ→АТФ (не у всех)
ПФГ (оптимальный pH 7,1—7,5)		Fungi
	АТФ→АДФ ↑ <i>Eubacteria</i>	АТФ→АДФ ↑ <i>Actinomycetes</i>
		АТФ→АДФ ↑ <i>Actinomycetes</i>

кокиназа (ПФГК) и полифосфатфруктокиназа (ПФФК), а также полифосфат-АМФ-фосфотрансфераза (ПФ-АМФ-ФТ), отсутствующие у *Eubacteria* и у грибов. Напротив, грибы обладают, как и в случае многих других их ферментных систем, системой энзимов с действием эндотипа, расщепляющей полифосфаты на разной длины олигомеры в середине их цепи. Эти энзимы действуют в противоположность предшествующим только в кислой зоне pH (оптимальный pH 3,2—3,4) и носят название полифосфатполифосфогидролаз, или полифосфатдеполимераз (ПФД). Они, видимо, имеют адаптивный характер.

Полифосфаты представляют собой чисто неорганические соединения, состоящие из мономеров ортофосфорной кислоты, чаще всего построенные в форме линейных неразветвленных цепей, содержащих от трех, четырех и до 300 мономеров фосфата (Кулаев,

1975):
$$\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{—O—P—O—} \\ || \\ \text{O} \end{array}$$
 Иногда они, видимо, встречаются в форме

двухфрагментного пирофосфата или циклических метафосфатов (например, три-, тетра- и гексамерных). Возможны также нестойкие сетчатые структуры и более стойкие сочетания фосфорной кислоты с двух- и трехвалентными металлами, образующими сетчатые структуры с фрагментами ортофосфата, как, например, обнаруженные у грибов (Кулаев, 1975), имеющие функции детоксикаторов избытка свободного ортофосфата и запасников фосфора и металлов (рис. 1.4).

Наиболее распространенная у грибов и энергетически доступная форма высокомолекулярных полифосфатов представляет собой линейные цепи с очень различным числом фрагментов фосфата,

существующие в виде непрерывного ряда соединений от пирофосфата (два фрагмента фосфата) до содержащих 300 фрагментов и более высокополимерных форм. Разделение их на фракции с помощью экстракции разными растворителями является довольно

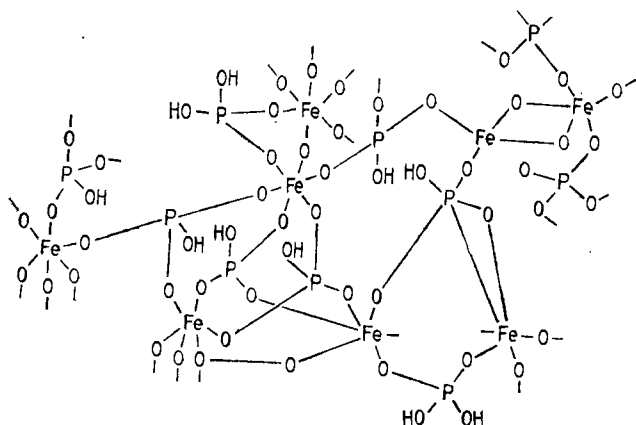


Рис. 1.4. Предположительная структура полимерного ортофосфата железа (Кулаев, 1975)

условным, однако дает все же возможность связать эти фракции с определенной их локализацией и функциями в клетке. Обычно насчитывают четыре-пять таких фракций (табл. 1.7).

Таблица 1.7

Характеристика степени полимерности разных фракций полифосфатов пивных дрожжей (Кулаев, 1975)

Номера фракций	Экстракция	Содержание полифосфатов		Средняя длина цепи, n	Средняя молекулярная масса калиевой соли
		мг г сухого вещества	% от общего фосфора		
1	1%-й раствор трихлоруксусной кислоты	0,54	6	4	530
2	насыщенный раствор NaClO_4	1,74	21	20	2 400
3	NaOH pH 10	0,33	4	55	6 500
4	0,05 н. NaOH	0,54	6	260	30 700
	Сумма полифосфатов	3,15	37	—	—

Согласно способу их экстракции эти фракции носят названия кислоторастворимой (ПФ_1), солерастворимой (ПФ_2), щелочерастворимых (ПФ_3 и ПФ_4) и растворимой в хлорной кислоте при нагревании (ПФ_5). Средняя длина цепи и средняя молекулярная масса каждой фракции, как можно видеть из результатов анализа

фракций из дрожжей (см. табл. 1.7), последовательно возрастают, достигая длины цепи порядка 260 *n* и молекулярной массы около 30 000. При этом четыре из перечисленных фракций были обнаружены у всех подробно изученных в этом отношении грибов (табл. 1.8).

Таблица 1.8

Содержание полифосфатов в клетках *Endomyces magnusii*, *Neurospora crassa* и в плодовых телах *Gyromitra esculenta* в мг фосфора на г сухого мицелия (Кулаев, 1975)

Фракция полифосфатов	Экстракция	<i>E. magnusii</i> клетки 12 ч. роста	<i>N. crassa</i> мицелий 17 ч. роста	<i>G. esculenta</i> плодовые тела
ПФ ₁	0,5 н. HClO ₄ ; 0—4 °C	1,10	0,62	0,00
ПФ ₂	насыщенный раствор NaClO ₄ ; 0—4 °C	0,90	1,24	1,52
ПФ ₃	NaOH pH 9,0; 0—4 °C	0,20	0,12	0,24
ПФ ₄	NaOH pH 12,0; 0—4 °C	0,90	0,82	0,01
ПФ ₅	10%-й раствор HClO ₄ ; 100 °C	0,40	0,00	—
Сумма полифосфатов		3,50	2,80	1,77
Общий фосфор		17,30	15,6	6,03

В общем итоге полифосфаты были найдены в мицелии грибов всех обследованных классов, а именно у двух миксомицетов, двух видов муконовых грибов, восьми сумчатых, двух базидиальных, 13 видов несовершенных и 14 видов дрожжей, т. е. у всех из обследованного 41 вида грибов (Кулаев, 1975). По-видимому, наиболее обильно у грибов представлена фракция ПФ₂, а в наименьшей степени фракции ПФ₃ и ПФ₅, однако их относительное количество сильно зависит от вида гриба, условий его роста и возраста культуры.

Биосинтез конденсированных полифосфатов по всем данным начинается в основном с наиболее высокополимерной фракции, а остальные получаются путем ее деградации. Однако возможны и восходящие синтезы за счет пирогосфата, освобождающегося в метаболических процессах, например при синтезе нуклеиновых кислот. Этим процессом, видимо, объясняется синхронное с синтезом РНК у *Neurospora crassa* накопление фракции ПФ₂, сочетающееся с уменьшением содержания наиболее лабильной кислоторастворимой фракции ПФ₁ (рис. 1.5).

Общие функции конденсированных линейных полифосфатов в клетках грибов весьма схожи с функциями АТФ и состоят в снабжении для метаболических реакций фосфором и энергией, высвобождающейся при разрыве макроэргической связи —О—Р—. Однако у них есть и сильные отличия от АТФ, так как, во-первых,

способность их к высокой степени полимеризации дает возможность резервировать большие запасы энергии и фосфора без нарушения гомеостаза клетки (рН, ионной силы, осмотической концентрации и т. д.). Это очень важно для характерных обилием этих соединений низших эукариот (грибов, водорослей и простейших) и прокариот (бактерий, цианей и актиномицетов), так сильно зависимых от окружающей их среды. Во-вторых, высокомолекулярные полифосфаты обладают определенной специализацией в метаболических процессах. По всей вероятности, наименее специа-

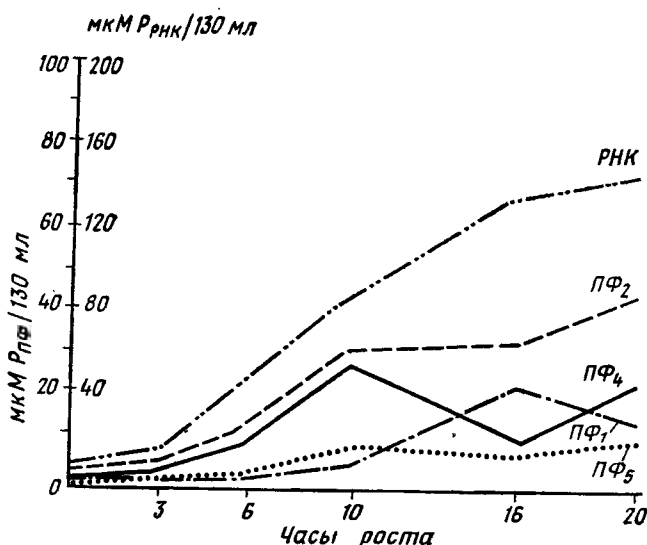


Рис. 1.5. Изменение содержания в мицелии различных фракций полифосфатов и РНК в процессе роста культуры *Neurospora crassa* в микромолях PO_4^{3-} на 130 мл среды (Кулаев, 1975)

лизирована лабильная фракция ПФ₁, участвующая как донор энергии во многих ферментативных процессах и синтезах. Фракция ПФ₂ специфично связана с синтезом нуклеиновых кислот. Более высокомолекулярные фракции участвуют в транспорте через клеточную мембрану сахаров, переносчика которых они фосфорилируют, а их синтез связан с синтезом полисахаридов клеточных оболочек. Последнее можно видеть по высоким коэффициентам корреляции между накоплением этих полисахаридов и соответствующих им фракций полифосфатов (табл. 1.9).

Проведенные Кулаевым, его учениками и рядом других исследователей работы по изучению локализации различных фракций полифосфатов в клетках грибов позволили обнаружить согласо-

ванность между процессами, сопровождающими их биосинтез, и местами их накопления в клеточных органеллах. В протопластах *Neurospora crassa*, освобожденных ферментом улитки от клеточной оболочки, оказались гидролизованными до оставшегося в прото-

Таблица 1.9

Коэффициенты корреляции (r) между скоростями накопления различных фракций полифосфатов и полисахаридов у *Saccharomyces carlsbergensis* (Кулаев, 1975)

Полисахариды	Полифосфаты	Коэффициент корреляции r
Гликоген	ПФ ₁	$0,077 \pm 0,02$
Сумма полисахаридов	сумма полифосфатов	$0,806 \pm 0,68$
Гликоген	ПФ ₂	$0,141 \pm 0,08$
»	сумма ПФ ₂ , ПФ ₃ , ПФ ₄ , ПФ ₅	$0,173 \pm 0,08$
Глюкан + маннан	»	$0,750 \pm 0,087$
Глюкан	ПФ ₂	$0,291 \pm 0,180$
»	ПФ ₃	$0,615 \pm 0,122$
Маннан	ПФ ₂	$0,136 \pm 0,192$
»	ПФ ₃	$0,035 \pm 0,196$
»	ПФ ₄	$0,813 \pm 0,098$

пласте ортофосфата обе наиболее высокомолекулярные фракции полифосфатов (ПФ₄ и ПФ₅), что указывало на их локализацию на поверхности клеточной мембраны вблизи от оболочки клетки (табл. 1.10).

Таблица 1.10

Содержание высокомолекулярных полифосфатов в клетках, протопластах, ядрах и митохондриях *Neurospora crassa*. Данные в мг фосфора/г сухого вещества (Кулаев, 1975)

Фосфорные соединения	Целые клетки	Протопласты	Ядра	Митохондрия
Сумма высокомолекулярных полифосфатов	5,6	3,0	0,2	0,0
Кислоторастворимые (ПФ ₁)	1,8	1,8	0,0	0,0
Солерастворимые (ПФ ₂)	1,0	1,2	0,2	0,0
Щелочерастворимые (ПФ ₄)	2,0	0,0	0,0	0,0
Экстракт горячей НСlO ₄ (ПФ ₅)	0,8	0,0	0,0	0,0
Ортофосфат	1,1	3,0	0,0	0,1
Общий фосфор	17,3	17,2	1,5	2,4

Дальнейшее фракционирование нативных клеточных органелл с помощью ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и их анализ показали наличие в ядре только одной фракции (ПФ₂), связанной с биосинтезом РНК. Кислоторастворимая фракция

(ПФ₁) и большая часть солерастворимой фракции (ПФ₂), скорее всего входящие в состав волютина грибов, остались в протопласте, где, как известно, протекает гриколиз; в месте локализации дыхательной цепи, в митохондриях, полифосфатов не оказалось совсем.

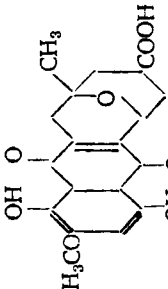
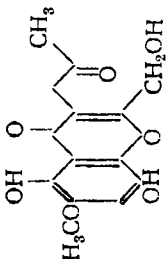
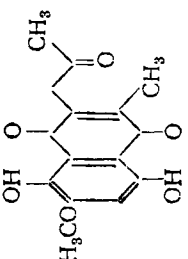
Относительно фосфорных соединений необходимо добавить, что, хотя мы и не имеем сейчас точных критериев для суждения о составе нуклеиновых кислот, можно все же утверждать, что они отличаются у грибов от других организмов по их количественной характеристике. Так, по нашим данным (Беккер, Дмитриева и др., 1972), доля ДНК от общего количества фосфорных соединений в мицелии *Aspergillus fumigatus* не превышает 7—9%, тогда как доля РНК достигает 65—70% от их количества. Если сравнить обогащенность клетки ДНК у разных организмов, то выясняется, что по этому критерию, так же как и по числу пар нуклеотидов на клетку, грибы находятся на относительно невысоком уровне сложности организации их генома, приближаясь в этом отношении к низшим беспозвоночным, как моллюски или губки. Они далеко отстают от высших растений, сложность организации генома которых сопоставима с таковой у птиц, рыб и ракообразных (Ленинджер, 1974). Однако при сравнении с бактериями сложность генома грибов оказывается выше на целый порядок (грибы — 0,02—0,17; бактерии — 0,002—0,06 мкг ДНК на клетку).

4. Антибиотики, токсины грибов и вещества — регуляторы проницаемости

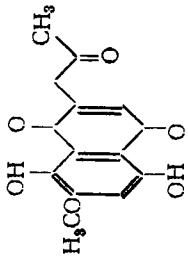
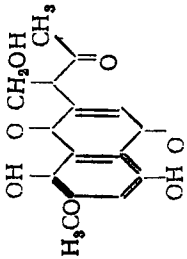
Из других типичных для грибов соединений, обычно вырабатываемых ими в небольших количествах, выявляются такие продукты адаптивного назначения, как антибиотики, токсины и амины — регуляторы проницаемости мембран. Все эти категории веществ встречаются и у других организмов с осмотическим питанием: у прокариот — бактерий и актиномицетов. Для грибов характерны определенные типы соединений, реже встречающиеся у прокариот. Последняя из упомянутых здесь категорий низкомолекулярных регуляторов проницаемости, видимо, характерна только для царства грибов. У бактерий же эта функция осуществляется преимущественно с помощью энзимов, в частности известной у многих патогенов гиалуронидазы. У грибов, подобно животным, она принадлежит обширному классу аминов.

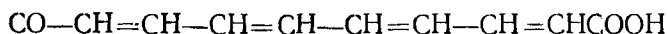
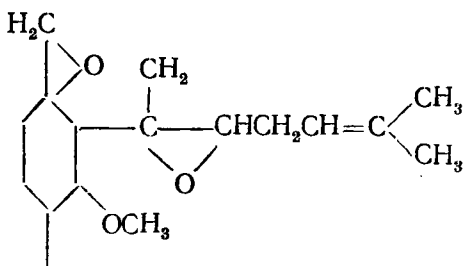
Антибиотики и токсины грибов часто схожи между собой, но если и отличаются друг от друга, то лишь небольшой деталью строения, например одной боковой группой. Это можно видеть на примере фитотоксинов и антибиотиков, образуемых видами рода *Fusarium* из секции *Martiella* (табл. 1.11), где в зависимости от замены в нафтохиноновой группе тех или иных заместителей в боковых цепочках осуществляются все переходы от фитотоксического к фунгицидному или бактерицидному эффекту (Kern, Naef-Roth, 1967):

Строение и свойства нафтазариновых производных, образуемых видами *Fusarium* из секции *Martiella*

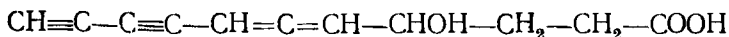
Производные	Строение	Минимальные дозы препаратов			
		для подавления роста проростков томатов, мг/кг (фитотоксичность)	для подавления роста <i>Basillia subtilis</i> мкг/мл; бактерицид- ность	для прорастания спор <i>Botrytis allii</i> мкг/мл (антифун- гальность)	для 50% подавления декарбоксилирования пирувата α-декар- боксилазой пивных дрожжей · 10 ⁻⁴ М
Мартицин и изо- мартин		8	60	500	660
Фузарубин		40	20	500	100
Яваницин		60	20	500	105

Продолжение табл. 1.11

Производные	Строение	Минимальные дозы препаратов			
		для подавления роста проростков томатов, мг/кг (фитотоксичность)	для подавления роста <i>Bacillus subtilis</i> мкг/мл (бактери- цидность)	для прорастания спор <i>Botrytis allii</i> мкг/мл (антифу- гальность)	для 50% подавления декарбоксилирования лигулата α-декар- боксилазой пивных дрожжей · 10 ⁻⁴ М
Норьяваницин		90	10	10	12
Новорубин		35	5	5	14



Фумагиллин



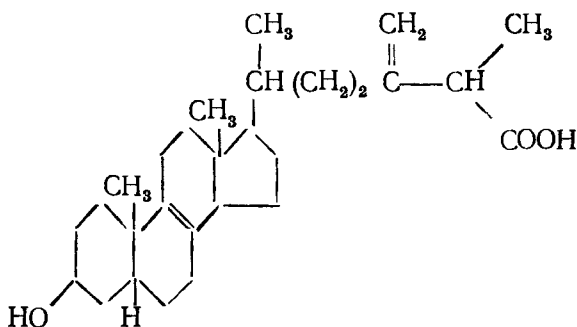
Немотиновая кислота



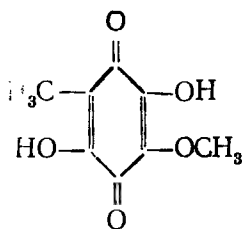
Одиссовая кислота

Характерной особенностью подобных метаболитов грибов с фитотоксическим или антибиотическим действием является отсутствие в структурах большинства из них азота. Почти, как правило, они являются алифатическими или ароматическими соединениями кислот природы, причем первые из них часто имеют неопредельный характер, обладая рядом двойных или тройных связей, т. е. структурой полиэнов, как фреквентин, палитантин или фумагиллин, или полиацетиленов, как немотиновая или одиссовая кислота (Беккер, 1963; Шиврина, 1965).

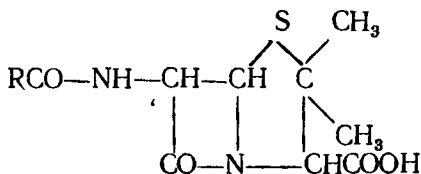
Циклических соединений среди антибиотиков и токсинов грибов еще больше, чем алифатических. К ним относятся многочисленные стеролы, такие, как полипореновая кислота и другие антибиотики высших базидиомицетов, гельволевая кислота, образуемая *Aspergillus fumigatus*, и разнообразного типа производные бензола, такие, как фумигатин, спинузолин и многие другие (Беккер, 1963; Шиврина, 1965). Все эти соединения часто представляют собой кислоты, спиртокислоты, альдегиды или кетоны:



Полипореновая кислота А



Спинулозин



Пенициллин (R — арил или алкил)

Много уже по разнообразию их строения круг антибиотиков пептидной природы, к которым относятся пенициллины и цефалоспорины. Они представляют собой относительно низкомолекулярные соединения трипептидного типа, чаще с не содержащими азота радикалами, в противоположность бактериальным и актиномицетным антибиотикам — пептидам с их чисто аминокислотным сложным циклическим строением.

Особенно типичными для грибов и совершенно несходными с характерными для прокариот оказываются их азотсодержащие соединения, относящиеся к токсинам, действующим на животных, принадлежащие к классу аминов (Беккер, 1975, 1977). Они обладают, как правило, способностью к повышению проницаемости клеточных мембран живых организмов. Их токсический эффект в отношении животных или растений объясняется свойством повышать проницаемость, являющимся приспособлением к осмотическому типу питания и к актам паразитизма или симбиоза (Беккер, 1977).

К таким соединениям относятся, например, лизергиновые алкалоиды спорыньи и пиридины рода *Fusarium*, многочисленные амины и холиновые соединения высших гименомицетов, среди которых часто встречаются и свойственные организмам животных и человека регуляторы проницаемости, кровяного давления и функций нервной системы, как гистамин, ацетилхолин и серотонин. Сильный нейротропный эффект грибных ядов объясняется влиянием в направлении повышения проницаемости, на основе которой осуществляются все функции центральной и периферической нервной системы.

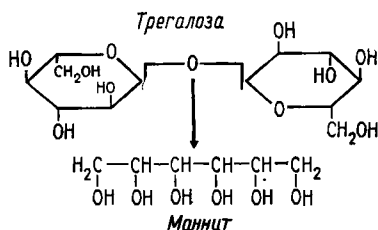
Арсенал этих соединений, имеющийся у грибов, намного шире, чем существующий у животных, что можно видеть хотя бы на примере производных серотонина, являющихся, как и антагонисты серотонина, лизергиновые алкалоиды, галлюциногенными соедине-

ниями. Никакой другой группой живых организмов, кроме животных и отдельных семейств высших растений, подобные соединения не продуцируются, и у грибов их обилие и разнообразие много больше, чем в двух упомянутых царствах природы. Более того, грибы-патогены не только продуцируют сами, но и способны индуцировать у высших растений-хозяев образование веществ с того же типа физиологическим эффектом повышения проницаемости мембран. Такие соединения из классов кумаринов и терпенов носят название фитоалексинов.

5. Запасные вещества грибов

«Запасные вещества» — термин не слишком точный, если им обозначать вещества, сохраняемые впрок для дальнейшего их использования, поскольку происхождение и функции их не всегда однозначны. В их число могут попасть и некоторые антибиотики, как накапливаемые в больших количествах полиацетилены, пигменты и отходы и продукты их ресинтеза после других биосинтетических процессов, как например волютин. В данном случае речь пойдет только о запасных веществах прямого назначения, т. е. об углеводах, жирах и мочеvine.

Из числа углеводов, локализованных в клетках грибов, для них характерны гликоген, маннит, дисахарид трегалоза (или микоза). Количество гликогена в плодовых телах и мицелии грибов может варьировать от 1,5 до 40% в зависимости от вида гриба и возраста плодового тела. В молодых плодовых телах и культурах грибов его соответственно больше на целый порядок, чем в старых с созревшими спорами.



Трегалоза — дисахарид (α -D-глюкозидо- α ,D-глюкозид) встречается обычно в небольших количествах, чаще в десятых долях процента по отношению к массе сухого мицелия, но иногда количество ее доходит до 1—2%. С ее использованием, видимо, связано накопление шестиатомного спирта, маннита, которого в плодовых телах грибов может накапливаться до 10—15%, особенно в гимении базидиомицетов. В значительных количествах он встречается у видов рода *Boletus* (*B. scaber*, *B. aurantiacus*, *B. crassus*). Маннит в большей степени присущ более зрелым мицелию и плодовым телам, что можно видеть из примера плодовых тел *Phallus impudicus*, в которых он преобладает над трегалозой. По-видимому, при метаболизме трегалозы в этих плодовых телах может синте-

зироваться маннит. Как трегалоза, так и маннит из числа других организмов свойственны в основном насекомым.

Из других веществ в мицелии грибов часто содержится много жира, скапливающегося в форме каплевидных включений, которые могут потребляться грибами при росте или споруляции. В молодом мицелии *Penicillium chrysogenum* количество его может достигать до 35%, тогда как в стареющем мицелии оно падает до 4—5% от массы сухого мицелия.

Для жиров грибов типично высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, олеиновой, линолевой, линоленовой и других, жидких при комнатной температуре, и большое количество неомыляемых липидов, т. е. стероидов. В мицелии *Penicillium chrysogenum* количество стероидов типа эргостерина достигает 1% от массы сухого мицелия. Есть основания считать, что у некоторых грибов на определенных стадиях их развития стероиды могут составлять до 80% от состава их жировой фракции, причем часто это бывают биологически активные вещества, токсины или витамины.

Накопление жиров у грибов часто зависит от возраста культуры или от состава питательной среды, в частности от наличия в ней углеводов. Как отмечалось, с повышением концентрации глюкозы в среде увеличивается количество жировых веществ. Хотя прямой пропорциональности между накоплением жиров и увеличением концентрации глюкозы и не существует, чтобы поднять количество жировых веществ в мицелии дереворазрушающего гриба вдвое, оказалось необходимым увеличить концентрацию сахара в питательной среде с 10 до 40% (Рипачек, 1967).

В противоположность всем другим группам организмов у грибов может накапливаться в качестве запасного вещества мочевины до 12—15% (Иванов, 1928, 1936).

6. Минеральные вещества в мицелии грибов

Изменение концентрации компонентов питательной среды сказывается и на накоплении минеральных веществ в мицелии. Количество золы в мицелии трутовика *Fomes marginatus* оказалось наибольшим при выращивании его на неразбавленной среде Варена (Рипачек, 1967).

Количество минеральных веществ золы, встречающееся у грибов, чаще всего колеблется в пределах от 6 до 12% от массы сухого мицелия. В их зольном составе обычно преобладают калий и фосфор и несколько меньше магния и железа. Ниже приведен состав преобладающих компонентов из мицелия продуцента пенициллина (%): зола — 11,9 (от массы сухого мицелия), фосфор — 2,35, кальций — 1,39, магний — 0,86, железо — 0,38.

Так как потребность в минеральных и других компонентах питательной среды складывается на основе преобладающих у данного вида путей метаболизма, состав основных компонентов золы грибов может сильно варьировать. Так, у дрожжей с их преобладанием гликолитического пути обмена, связанным с переработкой

углеводов через путь спиртового брожения, при слабом размножении клеток в составе золы обнаруживается до 50% фосфора, который особенно необходим для этих процессов, и 25% калия. Напротив, у малоспособных к спиртовому брожению, но сильно разрастающихся гифообразующих грибов наблюдается в их золе обратное соотношение. Около 50% ее составляет калий и порядка 25% — фосфор.

В остальных 25% от состава золы грибов можно обнаружить до 50 различных элементов, обычно встречающихся в почве: магний, железо, медь, цинк, марганец, кальций. Фосфор, калий и сера составляют контингент самых важных неорганических компонентов обмена и содержатся в наибольших количествах. В этом отношении грибы принципиально не отличаются от других живых организмов.

7. Специфичность химического состава грибной клетки

Из приведенного здесь обзора основных типичных компонентов грибной клетки можно видеть, что грибы представляют собою весьма своеобразную группу организмов, они исключительно гетеротрофны, что ставит их по сравнению с классическими представителями растительного мира в совершенно особое положение и сближает их по широкому ряду признаков направления и продуктов их метаболизма с животными (Беккер, 1975) (табл. 1.12).

Помимо других соединений особое место у грибов занимают стеролы, синтез которых на первом этапе протекает сходно с животными, т. е. по пути образования холестерина. Однако в дальнейшем у грибов он сводится в основном к синтезу эргостерина (Weete, 1980).

Из перечисленных в табл. 1.12 типичных для грибов веществ, входящих в состав их клеток или образуемых и выделяемых ими в окружающую их среду, свыше 60% оказываются свойственными тем или иным представителям мира животных, тогда как количество общих с растительными организмами не превышает 20%, и то они представлены у растений только в ограниченных таксономических группах или в отдельных органах.

Особенности грибов на морфологическом и субмикроскопическом уровнях, выделяющие их из царства животных и особенно растений, по шести пунктам были отмечены в книге Камалетдиновой и Васильева (1982). Определяя в значительной части упомянутой монографии свое отношение к выделению грибов в новое четвертое царство природы, авторы ее приводят в качестве доказательства справедливости такого вывода следующие шесть пунктов, подтверждающих их особое положение, отличное от свойств других эукариотов и подтверждаемое исследованиями на электроно-микроскопическом уровне:

1) для грибов характерно более сильное, чем у животных и растений, развитие агранулярного эндоплазматического ретикула;

Химический состав грибной клетки в сравнении с другими организмами

Группа соединений	Соединения, специфические для грибов	Наличие у фотосинтезирующих растений	Наличие у других организмов
Полимеры, входящие в состав оболочек	хитин, хитозан, глюканы и другие гетерополимеры сахаридов	нет нет ограниченно	членистоногие членистоногие бактерии
Запасные полисахариды	гликоген	нет	животные
Специфические сахара и спирты	трегалоза, маннит	нет нет	насекомые насекомые
Пигменты	кислые и метоксилированные каротиноиды, оомохромы	нет нет	ракообразные насекомые
Биогенные амины	алифатические амины, путресцин, гистамин, серотонин и его производные	в ограниченных семействах нет нет ограниченно в определенной фазе развития	— животные, бактерии животные, бактерии животные
Алкалоиды	пиридиновые, лизергиновые, кадаверин	в ограниченных семействах нет нет нет	— нет животные, бактерии животные
Производные холина	ацетилхолин, бетаин, другие производные холина, например мускарин	есть	
Стероиды	преобладающая структура C_{28} . преобладает эргостерин, способ образования: через ланостерол,	нет C_{29} нет через циклоартенол	нет C_{27} (у животных) нет через ланостерол (у животных)
Азотсодержащие запасные вещества	стероидные глюкозиды	очень ограничено	животные (жабы)
Жиры	мочевина	нет	отбрасываемый метаболит животных
Фосфорные макроэрги	много в вегетативном состоянии полифосфаты: очень много, адениловые нуклеотиды: очень мало	главным образом в семенах очень мало много	животные прокариоты и животные животные (много)

2) у них отсутствует характерная для растений и животных связь цитокинеза (т. е. деления клеток) с делением ядра;

3) типичный аппарат Гольджи, характерный для других эукариот, у них отсутствует или представлен в основном отдельными цистернами;

4) для высших сумчатых грибов характерен закрытый тип митоза с сохранением ядрышка его до конца;

5) для грибов характерен апикальный рост клеток, тогда как клетки животных растут изодиаметрично, а у многоклеточных растений путем их растяжения;

6) вместо характерных для животных и отсутствующих у растений центриолей у грибов в процессе кариокинеза присутствуют более упрощенно, чем у животных, организованные специальные полимерные тельца; близок к животным также наблюдаемый у грибов процесс цитокинеза путем бороздования, в котором известно для водорослей участие микротрубочек отсутствует.

Положение грибов в системе органического мира оказывается чрезвычайно обособленным, в том числе и с точки зрения биохимии, что оправдывает выделение их в особое, четвертое царство природы.

Для питания, т. е. для основного обмена грибов, необходимо приблизительно 17—18 элементов, в число которых входят азот, углерод, кислород, водород, сера, фосфор, калий, магний, железо, медь, цинк, марганец, молибден, кальций. Вероятно, им также нужно немного кобальта, а по некоторым данным, и галлий, бор, скандий, ванадий. В специальных синтезах (экологического значения) участвует также хлор, например в синтезе хлорсодержащих антибиотиков гризеофульвина и геодина. Возможно, что роль его и более широка.

В большом количестве грибам требуются следующие основные элементы: азот, углерод, кислород, водород, фосфор, калий, сера и магний. Поэтому в питательные среды на водопроводной воде, где достаточно микроэлементов, добавляют кроме источников азота и углерода только фосфорнокислый калий и сернокислый магний (источники калия, фосфора, серы и магния).

Методы изучения потребностей грибов в минеральных компонентах специально разработаны рядом авторов (Lilly, 1965).

Классический метод (разработан Стейнбергом) состоит в испытании на синтетической среде, очищенной от следов минеральных компонентов, с точной их дозировкой. Учет потребности в них производится в основном по интенсивности роста организма.

Функциональный метод состоит в определении элементов, необходимых для функции определенных ферментов. Исследуется способность этих элементов образовывать комплексы с ферментативскими белками, например, при использовании метода парамагнитной электронно-резонансной спектроскопии (Nicholas et al., 1962) изучалось образование белковых комплексов у бактерий с железом, марганцем, молибденом и медью.

В работах с минеральными компонентами необходимо учитывать два момента.

1. Возможность биологического замещения одного компонента другим. Полное замещение встречается редко, но частичное наблюдалось. Таким образом, можно не выявить потребность в элементе, если в среде есть его заместитель. Например, в питании *Allomyces arbuscula* (штамм Burman IDb) кальций можно полностью заменить хромом, стронцием, но стронций требуется в 10 раз больше, чем кальция (Lilly, 1965).

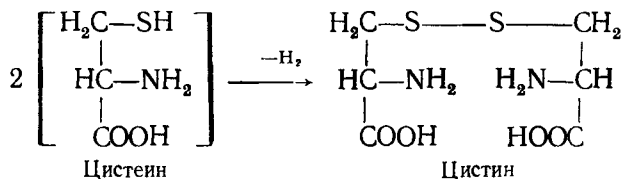
Аналогичное явление отмечено для замены цинка при синтезе протеинов, триптофана и других ароматических аминокислот через кадмий у *Aspergillus niger* (Bertrand, De Wolf, 1960). Калий частично замещается у *A. niger* натрием.

2. Возможность антагонизма ионов. Концентрация необходимого иона может зависеть от концентрации другого иона. Например, для *Saccharomyces carlsbergiensis* при увеличении концентрации натрия в среде нужно увеличивать и концентрацию калия для получения оптимальных условий роста. В результате увеличения концентрации натрия уменьшается усвояемость калия.

Накопление кобальта и никеля в клетках *Torula (Candida)* зависит от концентрации в среде магния (Lilly, 1965).

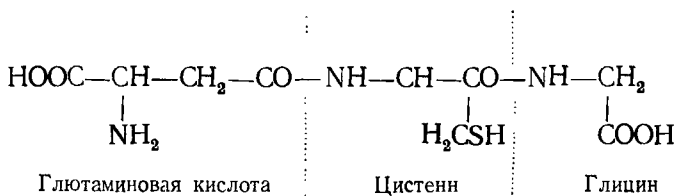
По требуемым количествам элементы питания делят на макроэлементы и микроэлементы. После азота, углерода, водорода, кислорода наиболее важные макроэлементы — фосфор и сера. Они участвуют почти во всех биохимических реакциях в живых организмах как энергодающие системы или акцепторы в процессах биосинтеза (при конденсации, циклизации, окислении, восстановлении и т. д., являясь компонентами коферментов).

Сера играет большую роль в структуре клеток, так как она входит в состав белков в виде серосодержащих аминокислот: цистина, метионина и др. Сера обеспечивает конформацию, т. е. пространственную конфигурацию ферментных белков, связывая части полипептидной цепи —S—S-мостиками. Она входит в состав очень реактивных сульфгидрильных соединений (содержащих свободную SH-группу), являющихся источниками водорода при восстановительных реакциях. Тип их трансформации можно видеть на примере превращения цистеина в цистин:



Так же функционирует трипептид-глутатион, составленный из глутаминовой кислоты, глицина и цистеина: $2\text{GSH} \xrightarrow{-\text{H}_2} \text{GS}-\text{SG}$

Строение глутатиона:



Другая функция серы состоит в стимуляции протеолитических ферментов, а отсюда и участие сульфгидрильных соединений в делении клеток. Поэтому SH-соединений много в молодых клетках. По некоторым данным, старение белков зависит от понижения их реактивности вследствие образования обильных мостиков ди-

**Извлекаемые из грибов ферменты, содержащие SH-группы
(Диксон, Уэбб, 1982)**

Класс ферментов	Фермент	Кофакторы	Реакция	Источники
Оксидазы	цитохромоксидаза (цитохром a_3)	глутатион Cu	$4\text{-ферроцитохром } c + O_2 \rightarrow 4\text{-феррицитохром } c + 2H_2O$	широко распространены
	цитохромпероксидаза	глутатион Fe^{2+}	$2\text{-ферроцитохром } c + H_2O_2 \rightarrow 2\text{-феррицитохром } c + 2H_2O$	плесневые грибы и дрожжи
	каталаза	глутатион Fe^{2+}	$2H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$ (донором H_2 может быть этиловый спирт)	широко распространены
Трансферазы	гликоген-УДФ-глюкозилтрансфераза	SH Mg^{2+}	$УДФ\text{-}глюкоза + (гликоген)_n = УДФ + (гликоген)_{n+1}$	дрожжи
	метионинаденозилтрансфераза	SH $Mg^{2+}M^{+}$	$АТФ + L\text{-}метионин + H_2O = \text{ортофосфат} + \text{пирофосфат} + S\text{-}аденозилметионин$	дрожжи
Лиазы	изоцитратлиаза	SH Mg^{2+}	$L\text{-}изоцитрат = \text{сукцинат} + \text{глиоксилат}$	плесневые грибы и дрожжи
Гидратазы и дегидратазы	аконитатгидратаза (аконитаза)	SH Fe^{2+}	$цитрат = \text{инсаконитат} + H_2O$	широко распространены
	дегидратаза диоксикислот	SH M^{2+}	$2.3\text{-диоксизовальерианат} = 2\text{-оксизовальерианат} + H_2O$	плесневые грибы и дрожжи
	имидазолглицерофосфатдегидратаза	SH Mn^{2+}	$D\text{-эритроимидазолглицерофосфат} = \text{имидазолацетальфосфат} + H_2O$	плесневые грибы
Изомеразы	изопентенилпирофосфат изомеразы	SH Mg^{2+}	$\text{диметилалилпирофосфат} \rightarrow \text{изопентенилпирофосфат}$	дрожжи

Примечание. M^{2+} и M^{+} —двух- и одновалентные металлы.

сульфида —S—S—, тогда как активная форма содержит SH-группы. Сера входит в состав ряда витаминов: тиамина, биотина и коэнзима А, участвующего в обмене кислот цикла Кребса, жирных кислот, липоидов и терпенов. Почти все реакции конденсации с присоединением двууглеродных фрагментов идут с участием КоА.

SH-группы являются необходимыми коферментами очень большого количества энзимов, чаще оксидаз, дегидрогеназ и гидратаз, присоединяющих воду (табл. 2.1). Часто функция SH-группы состоит в удерживании субстрата реакции в контакте с производящим реакцию коферментом (например, витамином) или в фиксации кофермента на апоферменте.

Сера в грибах (и в других организмах) в подавляющем числе случаев находится в восстановленной форме как производное сероводорода H—S—H , но источником ее могут служить только окисленные соединения (ионы SO_4^{2-} и SO_3^{2-}), далее восстанавливаемые грибами. Сульфиды металлов (FeS , Na_2S), как правило, непригодны для питания грибов. Исключение составляет *Ceratomyxa multiannulata* (*Ophiostoma multiannulatum*), не усваивающая сульфатов, а только сульфид аммония, цистин и цистеин (Лилли, Барнетт, 1953) и сапролегнии, нуждающиеся в серосодержащих аминокислотах. По Волконскому (Фостер, 1950), они относятся к паратиотрофам, а усваивающие сульфаты — к эутиотрофам. Сера требуется при добавлении ее в питательные среды в сотых или тысячных долях процента, но количество ее в клетках меняется в зависимости от ее концентрации в среде и от концентрации азота (так как она входит в состав белков) и может колебаться от 0,1 до 0,5% от массы сухого мицелия (Lilly, 1965).

Фосфор входит в виде ортофосфорной кислоты в нуклеопroteиды, функцией которых является передача наследственных свойств и синтез белков. В связи с этим он необходим всем живым организмам. В табл. 2.2 представлены обнаруживаемые у грибов содержащие фосфор нуклеопroteиды.

Накопление нуклеотидов в мицелии грибов соответствует преобладающему у данного вида или в данной фазе развития обмену. Например, у хитинообразующих грибов обилён уридинфосфатацетилглюкозамин (УДФАГ) в богатых жиром склероциях спорыньи (*Claviceps purpurea*) — цитидинфосфат, у дрожжей и в молодом мицелии *Penicillium chrysogenum* — АТФ (Белозерский, Кулаев, 1964; Крицкий, 1965; Мансурова, 1966). Датчиками энергии фосфорных связей обычно являются трифосфаты нуклеотидов (реже дифосфаты), но у грибов как источники энергии (связи —O—P—) еще широко используются неорганические полифосфаты, описанные в первой главе, накапливающиеся в мицелии иногда в очень большом количестве (Кулаев, 1975).

Фосфат является также обязательной составной частью большинства кофакторов окислительных, восстановительных, гидролитических и декарбоксилирующих коферментов, например НАД и НАДФ. Хотя роль фосфора как непосредственного кофактора ферментов кажется незначительной (табл. 2.3), однако почти ни одна

Нуклеотиды, обнаруживаемые в кислоторастворимой (в холодной хлорной или трихлоруксусной кислотах) фракции *Penicillium chrysogenum* или *Agaricus bisporus*

Кислоторастворимые нуклеотиды	В мицелии <i>Penicillium chrysogenum</i> (Мансурова, 1966)	В плодовых телах <i>Agaricus bisporus</i> (Крицкий, 1965)
АМФ	+	—
АДФ	+	+
АТФ	—	+
УМФ	+	+
УДФ	+	+
УДФГ	+	—
УДФ-галактоза	+	—
УДФАГ	+	+
ЦДФ	+	—
ЦДФХ (Х — этаноламин?)	+	—
ГМФ	+	+
ГДФ	—	+
НАД	+	—
ИМФ	+	—

Примечание. Обозначения в списке сокращений. ГМФ — нифосфат. гуанозинмонофосфат.

Таблица 2.3

Извлекаемые из грибов ферменты, активируемые фосфором
(по Диксону и Уэббу, 1982)

Класс фермента	Фермент	Кофактор	Реакция	Источник
Редуктаза	НАДФН ₂ -нитратредуктаза	Р флавин Мо Р	НАДФН ₂ + нитрат = = НАДФ + нитрит + + Н ₂ O мочевина + Н ₂ O = = CO ₂ + 2NH ₃	плесневые грибы
Дезаминаза	уреаза			плесневые грибы

ферментная реакция не обходится без фосфора как донора энергии. Весь обмен углеводов идет при обязательном фосфорилировании всех видов сахаров от триоз до седогептулозы, с присоединением от одной до двух молекул фосфорной кислоты, например, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат и т. д. С участием фосфорилирования протекают все процессы брожения и дыхания.

Вместе с азотсодержащим спиртом и жирными кислотами фосфор входит в состав фосфолипидов и других эфиров, например фитина (фосфорного эфира инозита).

Фосфор усваивается грибами в виде PO_4^{2-} , органических фосфатов и фосфатэфиров и требуется при введении в питательную среду в количестве от 0,1 до 0,2%. Некоторые грибы, например

растущий на среде с целлюлозой *Merulius (Serpula) lacrymans*, предпочитают органические фосфаты неорганическому ортофосфату. Содержание фосфора в грибах меняется в зависимости от возраста: в спорах и в молодом мицелии его всегда больше, чем в старом. Например, у *Aspergillus niger* на третий день культивирования его содержится 12,7 мкг на 1 мг массы сухого мицелия, а на девятый день — 2,4 мкг/мг (Lilly, 1965).

Близкие к этим данным были получены нами (Беккер, Дмитриева и др., 1972) для культивируемого на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой *A. fumigatus*, где общее количество определявшихся фосфорных соединений достигало 22—25 мкг/мг сухой массы мицелия (или 2,2—2,5%). При этом порядка 20—25% от их количества составляли кислоторастворимые полифосфаты, 4—5% — свободные нуклеотиды и около 70% — РНК. Количество ДНК не превышало 7—9% от общего количества определяемых фосфорных соединений, а соотношение между РНК и ДНК составляло почти целый порядок (РНК было в 7—8 раз больше, чем ДНК (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Количество фосфорных соединений в мицелии *Aspergillus fumigatus* из трехдневной культуры на чачалке на среде с кукурузным экстрактом и глюкозой (по Беккер, Дмитриевой и др., 1972)

Фосфорные соединения	Первая серия опытов		Вторая серия опытов	
	мкг/мг массы сухого мицелия	% к общему количеству фосфорных соединений	мкг/мг массы сухого мицелия	% к общему количеству фосфорных соединений
ДНК	1,95	8,88	1,73	6,92
РНК	14,77	67,31	16,66	66,66
Мононуклеотиды	0,93	4,23	1,39	5,56
Кислоторастворимые полифосфаты	4,29	19,55	5,21	20,84
Общее количество фосфорных соединений	21,94	100,00	24,99	100,00
Общее количество, % к массе сухого мицелия	2,19		2,50	

Для дрожжей указываются еще большие отличия в их концентрациях, а именно отношение ДНК : РНК составляло 1 : 50, а общая концентрация нуклеиновых кислот в ядре не превышала 10% от общего количества в мицелии. Такое высокое преобладание РНК над ДНК в клетке является, видимо, характерным для вегетативных форм роста очень многих грибов и отличает их от других организмов.

Калий требуется грибам в количествах, соизмеримых с фосфором (от 40 до 150 мг на литр среды), поэтому в питательных средах они дозируются вместе в виде фосфата калия. Калий весьма

специфичен и заменяется натрием и бериллием только частично. Он активирует ряд ферментов (табл. 2.5).

Из объективных данных можно заключить, что при недостатке калия у *Aspergillus niger* образуется много щавелевой кислоты, т. е. происходит неполное окисление и выделяется NH_3 вследствие торможения синтеза или аминирования органических кислот и отсюда торможения синтеза белка. При достаточном количестве калия и недостатке витамина B_1 происходит торможение декарбок-

Таблица 2.5

Извлекаемые из грибов ферменты, активируемые ионом калия
(Диксон, Уэбб, 1982)

Класс ферментов	Фермент	Кофакторы	Реакция	Источники
Дегидрогеназы Синте-тазы	альдегиддегидрогеназа,	K^+	альдегид + НАДФ + H_2O = = кислота + НАДФН ₂	дрожжи
	ацетилкоэнзимА-синтетаза	K^+	АТФ + ацетат + КоА = АМФ +	дрожжи
	пантотениатсинте-таза	Mg^{2+} K^+ Mg^{2+}	+ пирогосфат + ацетилКоА АТФ + l-пантоат + β-алаини = + АМФ + пирогосфат + l-пан- тотенат	плесневые грибы
	НАД-синтетаза	K^+ Mg^{2+}	АТФ + дезамидо-НАД-L-глу- тамин + H_2O = АМФ + пирогосфат-НАД + L-глу- тамаат (можно вместо глута- миниа использовать NH_3)	дрожжи

сирования продуктов углеводного обмена и накапливается пировиноградная кислота, следовательно, калий участвует в синтезе кетокислот (Lilly, 1965). Механизм действия калия на обмен углерода стал выясняться при изучении его роли в проницаемости и усвоении минеральных компонентов среды и в поддержке в клетке изменяющегося при дыхании и брожении нормального баланса ионов, особенно концентрации H^+ .

Оказалось, что K^+ , Na^+ и H^+ имеют одинаковый переносчик через мембрану, но сродство этого переносчика к натрию в 20—25 раз ниже, чем к калию, что и объясняет незаменимость калия в обмене. В отсутствие K^+ (компенсатора) концентрация H^+ -ионов в клетке должна повышаться до непереносимого белками плазмы предела вследствие накопления кислых продуктов дыхания и брожения и всасывания анионов, прежде всего H_2PO_4^- . Отсюда компенсация понижения рН при недостатке калия осуществляется в форме выделения NH_3 .

Сбалансированное усвоение организмами калия и фосфора объясняется тем, что фосфорная кислота в клетке ведет себя как обменная система анионов H_2PO_4^- и OH^- . При усвоении ее среда подщелачивается, а клеточное содержимое подкисляется. Однако K^+ способен входить в клетку наравне с H^+ и в 5 раз быстрее других катионов, но обратное вытекание его из клетки в 30 раз меньше, чем H^+ (из клетки способно выделяться 20 мкмоль/кг/ч K^+

против 600 мкмоль/кг/ч для H^+). Поэтому концентрация калия в клетке (при рН 6,0) может достигать 200 мкмоль/кг, а H^+ только 0,001 мкмоль/кг и вытекание H^+ из клетки при этом не прекращается.

Таким образом, K^+ всасывается из среды избирательно, даже когда внутренняя концентрация его в 5000 раз больше наружной. Натрий всасывается в 20 раз слабее калия, а выделяется намного быстрее.

Следовательно, калий непосредственно не участвует (Rothstein, 1965) в реакциях метаболизма, как микроэлементы и сера, в их энергетическом снабжении, как фосфор, или в композиции клеточных структур, как азот, кислород, водород и углерод. Его функция состоит в конструировании механизма обмена с внешней средой и в поддержании нормальных для обмена физико-химических условий гН, рН, баланса ионов в клетке.

Магний очень необходимый элемент. Потребность в нем близка к потребности в сере, что является обоснованием для применения его в средах в виде $MgSO_4$. *Aspergillus niger* требуется для оптимального роста 20 мг/л Mg^{2+} , *Allomyces arbuscula* — 9 мг/л.

Содержание магния в мицелии зависит от возраста культуры и типа источника азота. Так, клетки трехдневной культуры мицелия *A. niger* на среде с аммонийным азотом содержали 0,13%, а с нитратным — 0,26% магния (Lilly, 1965). Можно искусственно обогатить мицелий магнием на богатой им среде.

В дрожжах концентрация магния достигает 292 мкг/кг сырых клеток, но они плохо растут без достаточного количества калия в среде. Эти соотношения объясняются значением калия для усвоения $H_2PO_4^-$ и ролью магния в фосфорилировании. Магний является составной частью (кофактором) фосфатаз. Внешне это проявляется в согласованном усвоении обоих элементов: на каждые 36 атомов фосфора требуется 1 атом магния.

Магний играет большую роль в углеводном обмене и всех синтезах на основе использования энергии фосфорных связей. Около 50 ферментативных реакций у грибов идут с участием магния. Так, 18 фосфокиназ осуществляют фосфорилирование и перенос энергии фосфорных связей с одного соединения на другое, 16 трансфераз осуществляют с помощью энергии фосфорных связей синтезы с переносом углеродсодержащих фрагментов с одного соединения на другое. Ряд фосфатаз производят отщепление $H_2PO_4^-$, ряд синтетаз осуществляют конденсацию с участием фосфорилирования. Другие ферменты также действуют при участии магния (мутазы, изомеразы, лиазы и редуктазы) (Диксон, Уэбб, 1982).

В синтетазах магний участвует преимущественно совместно с калием. По-видимому, все же не все фосфатазы связаны именно с магнием, так как, например, он активизирует у *Penicillium chrysogenum* ферменты, деполимеризующие мета-, пиррофосфаты, АТФ при рН 6 и подавляет их при рН 3,5. С другой стороны, он возвращает активность фосфатазам, инактивированным цианидом (Sadasivan, 1965).

На пектиновые энзимы он влияет также различно в зависимости от оптимума их pH, подавляя энзимы *Botrytis cinerea* с оптимальным pH 4—5 и активируя энзимы *Pythium debaryanum* с оптимальным pH 8—9 (Ashour, 1954). Магний способен нейтрализовать действие ряда ядов (сулемы, борной кислоты) возможно вследствие антагонизма ионов. Магний сильно угнетает одни биосинтезы биологически активных веществ (например, токсинов урсовой болезни у *Fusarium sporotrichiella* var. roae — представляющих собой стероиды или трихотецины) и стимулирует другие (например, образование янтинеллина у *P. janthinellum* (Беккер, 1963).

Кальций в золе грибов содержится от нескольких единиц до 50%. Особенно часто он встречается в виде щавелевокислого кальция, например в мицелии *Merulius (Serpula) lacrymans*. Нередко кальций играет роль нейтрализатора избытка органических кислот, образующихся в обмене многих грибов. В отсутствие его урожай мицелия *Aspergillus niger* и *Fusarium* снижается. У некоторых водных форм грибов, например у *Allomyces arbuscula*, он принадлежит к числу обязательных элементов (Lilly, 1965) и участвует в транспорте аминокислот. Ион Ca^{2+} является также необходимым элементом для роста оомицета *Phytophthora infestans*, оптимально эффективным в концентрации от 50 до 500 мкМ (Окороков и др., 1976) (рис. 2.1). Специфичным переносчиком Ca^{2+} в мицелии и

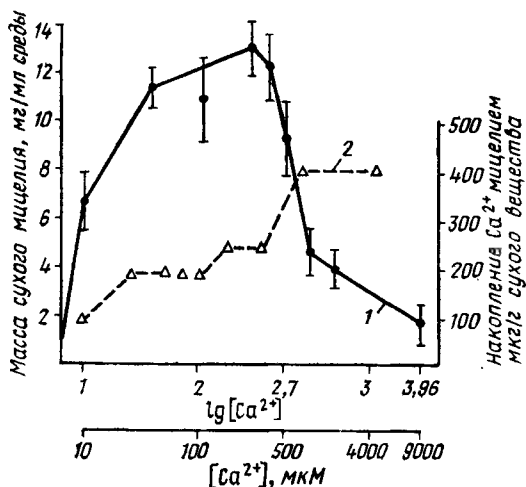


Рис. 2.1

Рис 2.1. Влияние концентрации кальция на рост *Phytophthora infestans*. 1—масса сухого мицелия; 2 — накопление в нем Ca^{2+} (Сысцев, 1979)

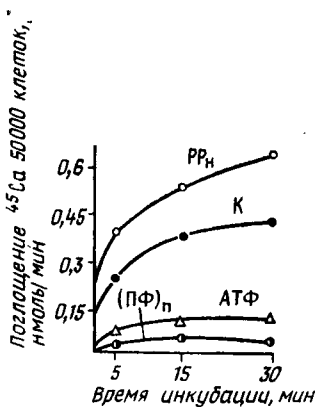


Рис. 2.2

Рис. 2.2 Влияние Mg^{2+} - АТФ (10 мкМ), Mg^{2+} - PPH (10 мкМ) и Mg^{2+} - (ПФ) (1 мкМ) на поглощение ^{45}Ca (1 мкМ) проростками *Phytophthora infestans*; К — контроль (Сысцев 1979)

донором энергии оказалась магниевая соль пирофосфата (PP_n), тогда как магниевые соли АТФ и полифосфатов (ПФ_n) ингибировали этот процесс (рис. 2.2; Сысуев, 1979). Неорганический фосфат не проявлял действия (Okorokov et al., 1978). Участвующая в освобождении энергии для переноса Ca^{2+} в клетку пирофосфатаза теряла активность при избыточном введении ионов Ca^{2+} в среду при инкубации *in vitro* (выше 5 мкМ), что должно вести к прекращению транспорта этого элемента в клетку (Сысуев и др., 1977; Сысуев, 1979). Оптимальная доза Ca^{2+} для роста *Phytophthora infestans* находится в пределах от 50 до 500 мкМ на грамм сухого мицелия, что составляет порядка от 0,2 до 2 мг на 1 литр культуральной среды. Роль иона кальция для метаболизма *P. infestans* в этих работах осталась не вполне ясной. Наблюдаемой в присутствии Са у другого оомицета *Achlya* стимуляции транспорта аминокислот установить не удалось у *Phytophthora* (Сысуев и др., 1977). Возможно, что Са замешан в функции проницаемости клеточных мембран этого гриба.

Кальций является составной частью (коферментом) ряда гидролаз (табл. 2.6), например α -амилазы и некоторых гидролаз цик-

Таблица 2.6

Извлекаемые из грибов гидролитические ферменты, содержащие Ca^{2+} (Диксон, Уэбб, 1982)

Фермент	Кофактор	Реакция
α -Амилаза	Ca^{2+}	гидролиз α -1,4-глюкоановых связей полисахаридов с 3 и более остатками α -глюкозы (крахмал, гликоген и родственные им полисахариды)
Циклогептаглюканаза	Ca^{2+}	гидролиз одной α -1,4-глюкоановой связи циклогептаглюкана с образованием линейного гептаглюкана
Циклогексаглюканаза	Ca^{2+}	гидролиз одной α -1,4-глюкоановой связи циклогексаглюкана с образованием линейного гексаглюкана с концевой β -конфигурацией (инверсия)

лических полисахаридов (Диксон, Уэбб, 1982). Вероятно, в силу конкуренции с магнием кальций может подавлять активность некоторых фосфатаз у *Penicillium chrysogenum* (Sadasivan, 1965).

Микроэлементы (или следовые элементы) необходимы для обмена в незначительных количествах (тысячных и десятитысячных долях процента, по Стайнбергу, от 0,3 до 0,02 мг/л). К ним относятся железо, цинк, медь, марганец, молибден, кобальт, бор и некоторые другие (для грибов также галлий, скандий). Они входят в состав ферментов. Для изучения потребности в микроэлементах у грибов большую роль сыграли работы Стайнберга (1919), исследовавшего ее на модели *Aspergillus niger*.

Железо — микроэлемент, требующийся в наибольшем количестве (0,001%), его даже добавляют в среды на водопроводной воде, например в среду Чапека. На среде без железа урожай *A. niger* снижается в 70 раз. Усваивается железо в основном в форме растворимых неорганических солей (сульфатов и хлоридов), но некоторые грибы удовлетворяются хелатами железа органического происхождения (гемы, цитохромы и другие), например *Pilobolus* (Page, 1962, цит. по Lilly, 1965). Железо входит в состав ряда важных окислительных ферментов со структурой порфиринов, особенно участвующих в дыхательной цепи и цикле Кребса (табл. 2.7).

Таблица 2.7

Извлекаемые из грибов оксигеназы, гидратазы и дегидрогеназы, активируемые Fe^{2+} (Диксон, Уэбб, 1982)

Фермент	Кофактор	Реакция	Источники
Протокатехинаксигеназа	Fe^{2+}	протокатехинат + $\text{O}_2 = 3\text{-карбоксисцисмуконат}$	плесневые грибы
Аконитатгидратаза (аконитаза)	Fe^{2+}	цитрат = цисаконитат + H_2O	широко распространены
Сукцинатдегидрогеназа	SH флавин Р	сукцинат + акцептор = фумарат + + восстановленный акцептор (акцептор феназиналкилсульфат)	дрожжи

К числу ферментов, содержащих железо как кофактор, относят каталазу, пероксилазу, цитохромы *b* и *c*, цитохромоксидазу и цитохромпероксидазу, но, кроме того, оно активирует ряд других ферментов. Механизм участия железа в окислительных реакциях представляют обычно следующим образом: $\text{Fe}^{2+} - \bar{e} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \bar{e}$. Сброс электрона с двухвалентного железа сопровождается выделением энергии. Специфическое влияние железа на обмен *A. niger* состоит в усилении процессов окисления: при дефиците железа образуется больше лимонной кислоты и меньше щавелевой, т. е. в присутствии его достигается более высокая степень окисления. Ввиду того что железо играет роль в некоторых этапах восстановления нитратов, в присутствии его в достаточных количествах некоторые грибы усваивают помимо обычного для них иона NH_4^+ еще и ион NO_3^- .

Кроме того, ионы железа обладают способностью резко усиливать активность некоторых антибиотиков, например ликомарамина у *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Однако все случаи участия железа в обмене не полностью обосновывают высокую потребность в нем. Более детальный анализ показал, что в окислительных ферментах участвует не более 20% требующегося для нормального обмена количества железа.

До 80% железа оказалось содержащимся в клетках в форме неорганических комплексов с фосфорной кислотой (Кулаев, 1975). Эти соединения, видимо, представляют собой механизм депонирования и детоксикации отщепляющегося при синтезах ортофосфата.

Этот механизм может быть основой для объяснения сходства симптомов хлороза (недостаток железа) и паразитарных токсикозов растений (тоже хлороз), при которых наблюдается как разобщение окислительного фосфорилирования (сброс H_3PO_4 без обратного включения в АТФ), так и хелирование железа токсинами паразитов (тогда хлороз является результатом накопления не связанной с железом фосфорной кислоты).

Физиологическое действие металлов часто резко возрастает при их сочетании. Эффект действия на грибы железа сильно возрастает в присутствии цинка. В опытах Стейнберга масса сухого мицелия *Aspergillus niger* без железа и цинка была равна 18 мг, в присутствии одного железа — 44, одного цинка — 40, в присутствии железа и цинка — 731 мг вместо $44 + 40 = 84$ мг, если бы эффекты этих микроэлементов просто складывались. Это можно связать с последовательным участием обоих элементов в ферментах дыхательной цепи (в первых ступенях ее — цинк, в последующих — железо).

Оба этих элемента участвуют также в активизации пектиновых энзимов у возбудителя вилта хлопчатника *Fusarium oxysporum f. vasinfectum*, для которого оптимальная концентрация железа составляет 20—40 мг/кг почвы (при тех же концентрациях магния), а оптимальная дозировка цинка 20 мг/кг почвы (Sadasiyan, 1965).

Цинк необходим для очень многих обменных процессов. Потребность в нем доказана для ряда видов *Aspergillus*, дрожжей, муковых грибов, например *Rhizopus nigricans*, и других зиго- и оомицетов, для ряда сумчатых грибов, патогенных грибов, возбудителей дерматомикозов и т. д. Основная роль цинка как кофактора дегидрогеназ, участвующих в углеводном обмене (табл. 2.8), демонстрируется его влиянием на экономический коэффициент (на увеличение массы сухого мицелия, отнесенного к весу использованных углеводов) и на увеличение выделения CO_2 (на повышение энергии дыхания).

При недостатке цинка окисление субстрата идет не полностью и в среде получается много побочных продуктов обмена, например органических кислот. В присутствии цинка их образование подавляется. Если источником углерода являются органические кислоты — винная, янтарная, глюконовая и т. д., то влияние дефицита цинка проявляется много слабее, что объясняется его участием в цикле дикарбоновых кислот Кребса. Цинк участвует в образовании, вовлечении в дальнейший обмен и превращении в аминокислоты многих окси- и кетокислот.

Образование фумаровой и молочной кислот у *Rhizopus* снижается при повышении концентрации цинка, что объясняется его участием как кофермента в дегидрогеназах молочной кислоты, D-2-оксикислот, а также алкоголя, глицеральдегида и т. д. (см. табл. 2.8). Специфичная необходимость цинка для обмена была показана при попытке заменить его химически близким кадмием, который мог пополнить дефицит его только при наличии в среде не менее 25 мкг/л исходного количества цинка, и оптимальное ко-

Извлекаемые из грибов дегидрогеназы, содержащие Zn^{2+}
(Диксон, Уэбб, 1982)

Фермент	Кофактор	Реакция	Источники
Алкогольдегидрогеназа	Zn	алкоголь + НАД = альдегид или кетон + НАДН ₂	дрожжи
D-лактатдегидрогеназа	Zn флавин	D-лактат + феррицитохром c = = пируват + ферроцитохром c	дрожжи
Галактозооксидаза	Zn	D-галактоза + O ₂ = галактогексодиаальдоза + H ₂ O ₂	плесневые грибы
Дегидрогеназа D-2-оксикислот	Zn флавин	D-лактат + акцептор = пируват + + восстановленный акцептор	дрожжи
Глицеральдегидфосфат- дегидрогеназа	Zn	D-глицеральдегид-3-фосфат + + НАД = 1,3-дифосфо-D-глице- риновая кислота + НАДН ₂ (действует и на другие альде- гиды)	широко распростра- нены
Глутаматдегидрогеназа	Zn	L-глутамат + H ₂ O + НАДФ = + 2-оксиглутарат + NH ₃ + + НАДФН ₂	?

личество кадмия на этом фоне (450 мкг/л) почти вдвое превышало оптимальное количество цинка (250 мкг/л), требуемое в этих условиях (Bertrand, de Wolf, 1961).

Специфический эффект цинка в отношении синтеза у *Aspergillus niger* аминокислот оказался наиболее выраженным для ароматических аминокислот с бензольным ядром: в первую очередь фенилаланина, а затем триптофана и тирозина, причем замена цинка в этом синтезе кадмием была возможна только для триптофана и тирозина.

Подавление триптофансинтетазы при цинковом голодании было показано для *Neurospora*. При недостатке цинка у *A. niger* подавляется (хотя возможно вторично, в результате угнетения обмена углеводов) и синтез алифатических аминокислот — аланина, глицина, пролина, треонина, серина, валина, лейцина, изолейцина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Влияние цинка на углеводный обмен *A. niger* сказывается и на синтезе нуклеиновых кислот, в котором в первую очередь, вероят-

но, страдает биосинтез рибозы и дезоксирибозы. Для них замена цинка через кадмий имеет слабый эффект (Bertrand, de Wolf, 1961). Какие именно из шести известных цинкозависимых энзимов гликолитического и пентозного циклов играют здесь основную роль, сказать трудно. Это могут быть как зависящие от цинка в процессе их синтеза глюкозоизомеразы, фосфофруктокиназа и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, так и содержащие цинк в качестве коэнзима глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа и особенно сильно зависящая от цинка альдолаза.

Участие цинка в образовании многих энзимов объясняется его особой ролью в синтезе их коферментов (ароматические аминокислоты, аминокислоты, НАД и т. д.), что отражается на продуцировании биологически активных веществ и других веществ специального экологического назначения, образующихся в боковых путях обмена. Например, цинк, введенный в концентрации, в 1000 раз превышающих концентрацию, оптимальную для роста (для роста достаточно 0,001 мг%), резко усиливает образование цитохрома и цитохромоксидазы у *Ustilago sphaerogena*.

Цинк сильно влияет на образование некоторых токсинов, например токсина уровской болезни (поина) у *Fusarium sporotrichiella* var. роае и других соединений стероидной структуры (Беккер, 1963). Он влияет на образование фузариевой кислоты у *F. oxysporum* f. *vasinfectum* (возбудитель фузариозного вилта хлопчатника), стимулируя его в концентрации около 250 мкг/л и угнетая при 400 мкг/л (рис. 2.3) (Kalyanasundaram, Saraswathi — Devi, 1955).

Действие цинка на формирование способности возбудителя вилта образовывать фузариевую кислоту в онтогенезе культуры про-

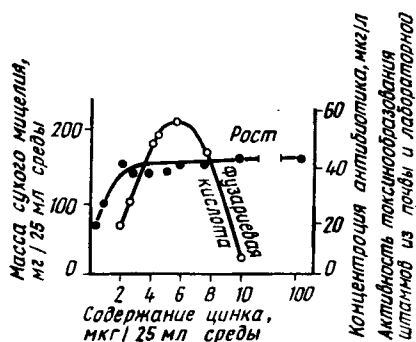


Рис. 2.3

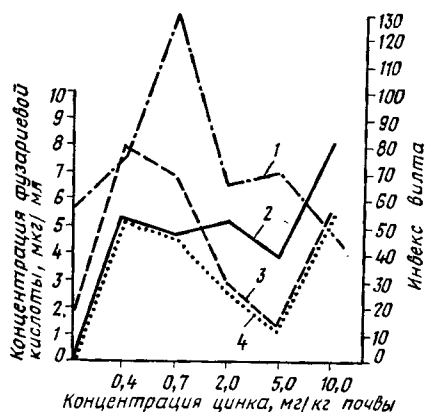


Рис. 2.4

Рис. 2.3. Действие цинка на рост и антибиотическую активность *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*

Рис. 2.4. Зависимость образования фузариевой кислоты в лабораторной культуре от концентрации цинка в среде (1), активность штаммов возбудителя вилта, выделенных из почвы с различным содержанием цинка (2), и интенсивность заболевания хлопчатника вилтом (3) на тех же почвах (Беккер Полетаева 1971)

является и как селекционирующий фактор. В почве при разной концентрации цинка формируются популяции *F. oxysporum*, производящие уровни активности фузариевой кислоты, свойственные исходной культуре при разных концентрациях цинка в питательной среде (рис. 2.4) (Беккер, Полетаева, 1968). Уровень вилтового токсина в хлопчатнике также воспроизводит эту кривую токсичности популяции возбудителя. Сопоставление данных спектрофотометрии пиридинов и активности фузариевой кислоты этих популяций показывает, что увеличение концентрации цинка в почве выше оптимума для синтеза фузариевой кислоты снижает только



ее синтез, но продолжает увеличивать способность к образованию нетоксичных соединений этого ряда (Беккер, Полетаева, 1971) (рис. 2.5). Цинк способствует также образованию многих пигмен-

Рис. 2.5. Изменение способности популяций *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* к образованию фузариевой кислоты (4) и других пиридинов, определяемых спектрофотометрическим (2) и биологическим (3) методами, и присущая им интенсивность заболевания (1) при их формировании в почве с различными дозами цинка (Беккер, Полетаева, 1971)

тов, например меланина у *Macrosporium* и хризогенина у *Penicillium chrysogenum*.

Медь имеет более ограниченное значение, чем железо и цинк, однако и она принадлежит к числу необходимых для грибов микроэлементов. Она требуется *Aspergillus niger* в количестве порядка 0,4 мг/л. Однако у *Nectria galligena* рост продолжает усиливаться и при концентрациях в 10 раз выше. Сильное влияние меди на рост *N. galligena* объясняется большой ролью ее в обмене тирозиназы (полифенолоксидазы, окисляющей тирозин), присутствующей у многих грибов, особенно у микоризообразующих базидиомицетов. Возможно, что медьсодержащие ферменты этого типа играют у ряда грибов роль в их энергоснабжении.

Кроме тирозиназы медь входит в состав таких оксидаз, как лакказы (полифенолоксидаза), оксидаза аскорбиновой кислоты, оксидаза цитохрома *a*₃, уратоксидаза (табл. 2.9), и участвует в этапах восстановления нитратов на ступенях нитрит- и гипонитрит-редуктаз (Lilly, 1965). У *A. niger* она играет роль при образовании и использовании лимонной кислоты (рис. 2.6). При добавлении в среду цитрата его потребность в меди заметно падает.

Как железо и марганец, медь сильно влияет у грибов на спорообразование и пигментацию спор. По этому признаку с помощью *A. niger* можно обнаружить концентрации меди в среде порядка

Извлекаемые из грибов оксидазы, содержащие медь
(Диксон, Уэбб, 1982)

Фермент	Кофактор	Реакция	Источники
Уратоксидаза (уриказа)	Cu	урат + O ₂ = неидентифицированные соединения	адаптированные дрожжи
Катехолоксидаза (фенолоксидаза, тирозиназа)	Cu	2-о-дифенол + O ₂ = 2-о-хинон + 2H ₂ O (действует на разные ди- и монофенолы)	грибы
Цитохромоксидаза (цитохром a ₃)	Cu глют.	4-ферроцитохром c + O ₂ = 4-феррицитохром c + 2H ₂ O	широко распространены
n-Дифенолоксидаза (полифенолоксидаза, лакказы)	Cu	2-n-дифенол + O ₂ = 2n-хинон + H ₂ O	грибы

0,05 мкг/50 мл. Медьсодержащие оксидазы, видимо, участвуют также в образовании меланниновых пигментов грибов (табл. 2.9).

Потребность в меди была доказана для *A. niger*, *A. flavus*, *Rhizopus* sp., *Sclerotium rolfii*, *Cercospora nicotianae*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium inegulare*, *Thielavia basicola* (Steinberg, 1950). Не исключается, что медьсодержащие оксидазы участвуют также в детоксикации ароматических антисептиков для древесины типа креозота, начиная, таким образом, сукцессию грибов на обработанной ими древесине. Первыми поражают ее грибы, содержащие меланины.

Марганец нужен грибам в очень небольшом количестве порядка 1 : 10⁹. Однако он играет существенную роль в обмене как кофактор щавелевоуксусной и щавелевоянтарной карбоксилазы — фермента, участвующего в основной реакции усвоения CO₂ у гетеротрофов путем присоединения ее к энолпировиноградной кислоте. Общее число обнаруженных у грибов ферментов, где марганец является кофактором (табл. 2.10), невелико, и они главным образом участвуют в трансформации органических кислот цикла Кребса.

Марганец вместе с медью участвует как кофактор в образовании и потреблении лимонной кислоты у *Aspergillus niger* и предположительно — в ее синтезе как кофермент аконитазы. Некоторую роль играет марганец и в азотном обмене, активируя аргиназу дрожжей и входя в состав гидроксилламинредуктазы у плесневых грибов (Диксон, Уэбб, 1982). Последний энзим был обнаружен у *Neurospora crassa* при восстановлении этим организмом гидросиламина в аммиак (Lilly, 1965).

Марганец специфично угнетает образование пектолитических энзимов у *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*, конкурируя при этом с железом. При соотношении железа и марганца 1:2 образование пектиновых энзимов у этого паразита хлопчатника падает и соответственно снижается вызываемое им заболевание хлопчатника фузариозным вилтом (Sadasivan, 1965).

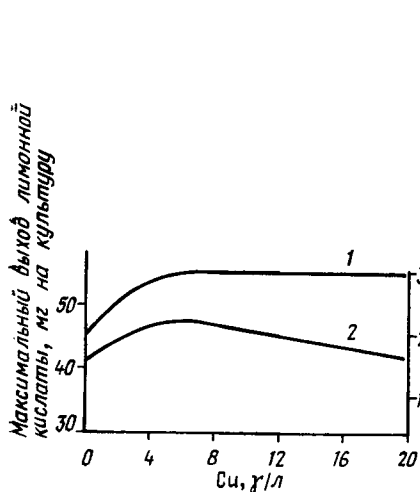


Рис. 2.6

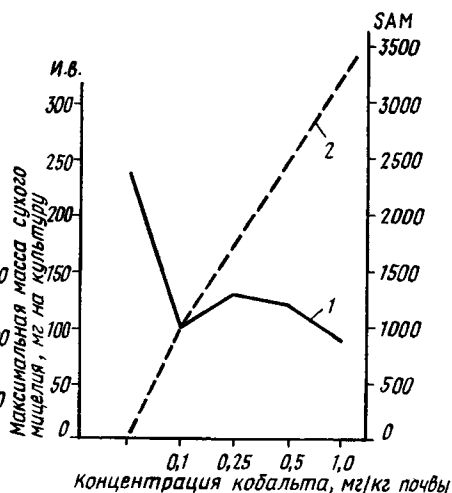


Рис. 2.7

Рис. 2.6. Влияние меди на изменение массы мицелия (1) и содержание лимонной кислоты (2) в культуре *Aspergillus niger*. Увеличение количества меди в среде выше 6—7 мкг/л приводит к снижению количества лимонной кислоты в культуральной жидкости (Bertrand, de Wolf, 1960)

Рис. 2.7. Интенсивность заболевания хлопчатника фузариозным вилтом (и. в. — 1) и накопление в нем переносчика метильных групп S-аденозилметионина (SAM — 2) при различных дозировках кобальта в почве (Беккер, Полетаева, 1971)

Молибден требуется грибам в наименьшем количестве по сравнению с другими микроэлементами; обнаружено до сих пор его участие всего в одном метаболическом процессе — восстановлении нитрата в нитрит (первый этап пути восстановления соединений азота осуществляется системой нитратредуктаз). Вероятно, с этим процессом связано участие молибдена в фиксации атмосферного азота у бактерий и сине-зеленых водорослей, в котором играет основную роль система ферментов, названная нитрогеназой (Кретович, 1972). Этим объясняется также, что *Aspergillus niger* на среде с солями NO_3^- требует больше молибдена, чем на среде с NH_4^+ . Молибден является коэнзимом нитратредуктазы, что подтверждается реактивирующим эффектом добавки молибдена к нитратредуктазе *A. niger*, инактивированной цианидом

Извлекаемые из плесневых грибов дегидрогеназы, редуктазы, дегидратазы и лиазы, содержащие Mn^{2+} (по Диксону, Уэббу, 1982)

Фермент	Реакция
Изоцитратдегидрогеназа	$L\text{-изоцитрат} + НАД = 2\text{-оксиглутарат} + CO_2 + НАДН_2$ $L\text{-изоцитрат} + НАДФ = 2\text{-оксиглутарат} + CO_2 + НАДФН_2$ (декарбоксилирует также оксалсукцинат)
Гидроксиламинредуктаза	$NH_3 + \text{акцептор} \rightleftharpoons NH_2OH + \text{восстановленный акцептор}$ (доноры водорода флавины)
Имидазолглицерофосфатдегидратаза	$D\text{-эритроимидазолглицерофосфат} = \text{имидазолацетолфосфат} + H_2O$
Оксалацетаза (оксалацетат-лиаза)	$\text{оксалацетат} + H_2O \rightleftharpoons \text{оксалат} + \text{ацетат}$

В других этапах пути восстановления NO_3^- кроме молибдена участвуют медь, железо, марганец:



Дефицит молибдена у грибов наблюдается редко, однако он возможен в условиях избытка конкурирующей с этим элементом меди. Наоборот, дефицит меди в результате присутствия избытка молибдена в почве мы наблюдали в Ферганской долине, что отразилось на торможении образования антибиотиков типа геодина у почвенных грибов, антагонистов возбудителя вилта.

Хлор необходим грибам в основном для синтеза хлорсодержащих антибиотиков: геодина (*A. terreus*), гризеофульвина (*Penicillium nigricans*, *P. urticae* и *P. janthinellum*), хлорсодержащего метаболита калдариомицина (*Caldariomyces fumago*), нидулина (*A. nidulans*), налгиолаксона (*P. nalgiovensis*) (Miller, 1961). Однако у грибов известен один фермент, в составе коферментов которого имеется хлор (табл. 2.11), это арилсульфатаза-эстераза, расщепляющая ароматические эфиры серной кислоты (Диксон, Уэбб, 1982).

Кобальт принадлежит к числу микроэлементов, обязательных для животных и бактерий, участвуя в составе витамина B_{12} в синтезе метионина и тимидиновой части нуклеотидов ДНК. Выясняется также, что, видимо, он участвует в последнем этапе системы нитратредуктазы (или нитрогеназы), способствуя восстановлению гидроксиламина в аммиак (Ягодин, 1970). Однако необходимость кобальта для грибов пока подтверждена слабо, так как очистить от него среду до уровня, выявляющего его дефицит, пока не уда-

Извлекаемые из грибов ферменты, активируемые Mo и Cl^-
(Диксон, Уэбб, 1982)

Фермент	Кофактор	Реакция	Источники
НАДФН ₂ -нитратредуктаза	Mo, флавин, Р	НАДФН ₂ + нитрат = НАДФ + нитрит + H ₂ O	плесневые грибы
Арилсульфатаза (эстераза)	Cl ⁻ (в некоторых случаях)	фенолсерный эфир + H ₂ O = фенол + H ₂ SO ₄	плесневые грибы

лось, вероятно, вследствие очень малых необходимых количеств кобальта для синтеза ДНК ядер, имеющих у грибов очень малые размеры, особенно в вегетативном мицелии.

Тем не менее существование потребности в витамине B₁₂ у дрожжей (*Kloeckera brevis*), на которых можно его тестировать, и данные о способности к его синтезу у *Aspergillus niger* (Lilly, 1965) подтверждают необходимость его для грибов. Для экологии грибов-паразитов существенно, что кобальт усиливает метилирующие системы, в частности накопление переносчика метильных групп, S-аденозилметионина, приводящие к детоксикации фитотоксинов грибов, например фузариевой кислоты при вилте хлопчатника (Полетаева, 1969; Беккер, Полетаева, 1971; рис. 2.7, табл. 2.12).

По некоторым данным, в определенных условиях у грибов встречается потребность еще в нескольких микроэлементах. Например, *галлий* по данным Стейнберга стимулирует рост *A. niger* при добавлении его в количестве 0,02 мг/л, 76 других испытанных микроэлементов не заменяли его.

Скандий оказался необходимым для *A. niger* при росте его на глицерине как источнике углерода, но на средах с сахарами потребность в нем отсутствовала.

По некоторым данным, *бор* также способствует росту и развитию грибов.

Существуют микроэлементы, которые сами по себе не необходимы, но влияют на усвоение других микроэлементов и могут частично заменить их или изменить направление обмена и нарушить баланс обменных процессов.

На фоне избытка необходимых микроэлементов они не влияют на рост, развитие и обмен, но при недостаточных дозах влияют очень сильно как в случае естественного недостатка их в природе, так и при дефиците, создаваемом действием многих неметаллических ингибиторов, таких, как CO, мышьяк, группы SH, CN и другие.

Приведем примеры известных микроэлементов — заменителей и конкурентов.

Хроматографический анализ экстрактов 4,5 и. HClO_4 из свежих растений хлопчатника, выросших на выловом фоне без добавки в почву кобальта (контроль) и с добавкой в нее 0,2 и 2,0 мг/кг CoCl_2 . Система растворителей: этанол — вода — уксусная кислота (65 : 34 : 1). Проявление пятен нингидрином (Беккер, Полетаева, 1971)

№ пятна хроматогр-амы	Rf экстрактов из контрольных растений		Добавка 0,2 мг Со на 1 кг почвы		Добавка 2,0 мг Со на 1 кг почвы		Rf вещества на хроматограмме в той же системе (по данным литературы)	
	№ 1	№ 2	Rf	площадь пятна, мм ²	Rf	площадь пятна, мм ²	Rf	вещество
1					0,19	1190		
2					0,23	756	0,23	аденозинтрифосфат
3			0,31	960	0,31	3404	0,30	S-аденозилметионин
4	0,36	0,37			0,35	8448		
5			0,40	1944	0,41	1140	0,44	аденозин-5-монофосфат
6	0,53	0,48	0,54	5311	0,53	9450	0,59	аденозин
7		0,55	0,62	1170			0,63	аденин
8			0,64	2400			0,63	гомосерин
9	0,65	0,66	0,65	3127				
10	0,72						0,72	метионин
11		0,75					0,75	метилтиоаденозин
12	0,83							

1. Ванадий способен частично заменять молибден при усвоении азота (у *Azotobacter* и *Anabaena*), но на фоне избытка молибдена он не влияет (Насон, 1962).

2. Вольфрам, напротив, конкурирует с молибденом, уменьшая усвоение Мо при его дефиците и угнетая рост *Azotobacter vinelandii* (Килер, Вернер, 1962). Как конкурент молибдена известна также медь.

3. Уже упоминалось о способности кадмия заменять частично цинк, в частности в процессах биосинтеза триптофана и тирозина у *Aspergillus niger* (Bertrand, de Wolf, 1961).

4. Конкурентами содержащих магний ферментов часто проявляют себя кальций и стронций, конкурируя с магнием в фосфатазах и синтетазах. При пониженных дозах магния у грибов различных видов (*Fusarium sporotrichiella*, *Trichothecium roseum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusella olivacea*) стронций способствует торможению конденсации структурных единиц терпенов в цепь (каротиноиды) и циклизации их на стадиях C_{15} (фарнезол) или C_{30} (скавален), приводя к преимущественному образованию циклических спиртов (трихотеколон, фумигаллол) или стероидов (поин, фузеллин и т. д.) (Беккер, 1963).

Вопрос о сочетании и конкурентных отношениях микроэлементов в питании грибов важен как при использовании микроэлементов в сельском хозяйстве (микроудобрения), так и для микробиологической промышленности.

ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА В ПИТАНИИ ГРИБОВ И УГЛЕРОДНЫЙ ОБМЕН

1. Источники углерода в питании грибов

Гетеротрофность грибов выражается в основном в их потребности в органических источниках углерода, по отношению к которым они практически всеядны и не используют только некоторые пластики и «неразрушаемые» детергенты (Perlman, 1965). Отсюда вытекает их негативное практическое значение как разрушителей всевозможных строительных и других материалов, пищевых продуктов, изделий и моторных топлив.

Однако при этом выявляются и полезные свойства таких грибов, заключающиеся в возможности их использования для переработки разнообразных отходов промышленности и всевозможных органических остатков, накапливающихся в биосфере.

Используемый грибами круг источников углерода очень велик. Неполный список органических соединений, используемых грибами как единственный источник углерода, включает 155 соединений и состоит из 56 углеводов, сахарных кислот и спиртов производных сахаров, 43 аминокислот и других азотсодержащих соединений, 40 органических кислот и их сложных эфиров и 16 стероидных соединений и алкалоидов.

Обычно алифатические соединения более питательны для грибов, чем ароматические. Исключение для *Aspergillus niger* составляет хинная кислота, но у нее другое распределение двойных связей в молекуле, при котором разрыв кольца протекает значительно легче, чем у ароматических соединений типа бензола.

Питательная ценность углеводов обычно учитывается по газообмену и по массе образующегося на среде с ними мицелия. Особенно хорошо усваиваются из числа сахаров находящиеся на первом месте по питательной ценности гексозы, содержащие шесть атомов углерода, в первую очередь глюкоза и фруктоза. Фруктоза усваивается несколько слабее, чем глюкоза, и еще слабее галактоза.

Однако такие водные грибы, как например *Leptomit*, не используют глюкозу, фруктозу, галактозу и сахарозу. Также некоторые штаммы головневового гриба *Ustilago striiformis* при пересеве их со среды с сахарозой на среду с глюкозой три-четыре недели приспосабливаются к глюкозе, пока не приобретают способность усваивать ее достаточно интенсивно. Из дисахаридов сахароза потребляется лучше, чем лактоза. Пентозы менее доступны для грибов, чем гексозы, и среди них ксилоза доступнее арабинозы. Некоторые виды рода *Fusarium* (например, *F. oxysporum*, вызы-

вающий вилт табака) хорошо усваивают ксилозу, а также мальтозу, но экономический коэффициент потребления сахаров у него выше на левулозе (Wolf, 1955). Для *Fusarium moniliforme* сахара распределяются в порядке следующего ряда интенсивности их использования: глюкоза > фруктоза > l-арабиноза.

На втором месте по питательности после моносахаров находятся ди-, три- и полисахариды. Однако есть исключения, например возбудитель фузариозного вилта хлопчатника *F. oxysporum* f. *vas-infectum* лучше развивается на средах с белками и крахмалом, чем на среде с глюкозой. При росте его на средах с целлюлозой, липидами и ДНК наблюдается длительная лаг-фаза, которая сокращается только при добавлении в среду глюкозы. Также ряд оомицетов, например некоторые сапролегниевые грибы (*Apodachlya brachynema*) и ряд видов *Phytophthora*, предпочитают моносахарам крахмал и декстрин. *Allomyces* использует только мальтозу, сахарозу и декстрин (Лилли, Барнеп, 1953). Многие сапролегниевые грибы вообще не потребляют углеводы, например *Leptomitius lacteus*, для которого источником углерода служат жирные кислоты и аминокислоты.

Правило предпочтения гексоз действительно для большей части почвенных и паразитных грибов. Например, возбудители антракноза виды *Colletotrichum* и *Gloeosporium* (Tandom, Agarwala, 1956) хорошо растут на среде с глюкозой, фруктозой, маннозой и рамнозой и особенно интенсивно — на среде с двумя первыми сахарами. Ксилозу и арабинозу хорошо используют не все виды этих родов грибов.

Спирты, производные моносахаров, например маннит, усваиваются хорошо, так же как и сахарные кислоты: глюконовая, глюкуроновая и сахарная. Исключение составляют некоторые дерматофиты, не потребляющие маннита, — признак, которым пользуются в систематике рода *Sporotrichum*.

На смесях углеводов рост грибов нередко заметно усиливается, что имеет экологическое значение, поскольку в природных условиях им приходится встречаться с гетерогенными смесями источников углерода. Примером усиления роста на смеси сахаров может служить *Aspergillus niger*, показывающий массу сухого мицелия на среде с 18 г галактозы — 42,4 мг, на среде с 2 г глюкозы — 145,6 мг, а на среде со смесью из 18 г галактозы и 2 г глюкозы — 577 мг. При сложении эффекта влияния на массу мицелия двух сахаров должна была бы получиться масса сухого мицелия, равная 188 мг (Steinberg, 1939). Сходные явления наблюдались у видов рода *Gloeosporium*, которые при росте на смесях из маннита, раффинозы, галактозы и сорбита показывали гораздо более интенсивную споруляцию, чем на средах с каждым из этих веществ в отдельности (Tandom, Agarwala, 1956). На основе улучшающего рост эффекта смесей углеводов производилась композиция целого ряда питательных сред. Например, среда Билай для видов рода *Fusarium* составлена с включением по 1% глюкозы, сахарозы и крахмала

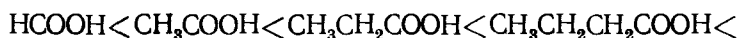
Для сред со смесями углеводов и органических кислот установлена определенная очередность потребления их компонентов. Например, *Penicillium chrysogenum* сначала усваивает в такой среде ацетат, вторыми — лактат и часть глюкозы и в последнюю очередь — лактозу.

Выращивание на среде со смесью углеводов может в ряде случаев способствовать адаптации гриба к определенному сахару, который не может быть использован с помощью конститутивных, т. е. присутствующих в первоначально образовавшемся мицелии энзимов. Примером может служить выращивание грибов на среде с сорбозой, слабо или совсем не поддерживающей рост многих грибов (Lilly, Barnett, 1953).

При выращивании на средах с сорбозой в комбинации с мальтозой или глюкозой, поддерживающими рост грибов из адаптирующейся к сорбозе группы (*Choanephora*, *Mucor*, *Phycomyces*), эти грибы растут и вырабатывают ферменты, нужные для усвоения сорбозы. При этом настолько усиливается рост культур на средах с добавкой сорбозы, что это нельзя объяснить только суммированием питательной ценности обоих сахаров, как в случае видов *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium*.

Неспособная адаптироваться к сорбозе группа грибов (*Alternaria*, *Rhizoctonia* и *Sclerotinia*) оказывается угнетенной в росте на средах со смесью сахаров, содержащей сорбозу, так как сорбоза способствует торможению их метаболизма.

Питательное значение алифатических кислот возрастает с увеличением длины углеродной цепи до шести углеродов, а именно в форме ряда с увеличивающейся интенсивностью их усвоения:



Муравьиная
кислота

Уксусная
кислота

Пропионовая
кислота

Масляная
кислота



Валериановая кислота

Двухосновные кислоты более питательны, чем одноосновные, а оксикислоты усваиваются лучше, чем обычные, например:



Пропионовая
кислота

Молочная
кислота

Янтарная кислота

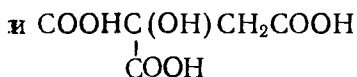


Фумаровая кислота

Яблочная кислота

Большую питательную ценность для грибов имеют также и другие дикарбоновые и трикарбоновые кислоты, содержащие гидроксильные группы, например: $\text{СООНСН}(\text{ОН})\text{СН}(\text{ОН})\text{СООН}$

Винная кислота



Лимонная кислота

Особенно хорошо усваиваются грибами соединения, содержащие группировки —CH(OH)— , чем и объясняется высокая питательная ценность оксикислот и сахаров.

Однако запас энергии в окисленных соединениях обычно меньше, чем в менее окисленных. Бедна ею карбоксильная группа —COOH— , что видно из слабого использования таких кислот, как муравьиная НСOОН и щавелевая COOH—COOH , которая практически совсем не потребляется и обладает токсичностью.

Для усвоения углеводов и кислот большое значение имеет их пространственная изометрия, что было обнаружено еще Л. Пастером. Исследовавшийся им штамм из рода *Penicillium* лучше использовал (+)винную кислоту, чем (–)винную, на основе чего оказалось возможным отделить левовращающую винную кислоту из ее рацемической формы.

Некоторые виды грибов потребляют органические кислоты очень слабо, например *Pleospora indica*, паразит пальмы *Cycas revoluta*. Она растет только на среде с сахарозой, плохо — на среде с крахмалом и инулином и из двенадцати испытанных органических кислот не использует ни одной (Mandahar, 1965).

Наивысшей питательностью для грибов обладают спирты с шестью атомами углерода (например, маннит); меньшей — трехатомные спирты, как глицерин, и очень слабой — одноатомные типа этилового и метилового. Альдегиды и кетоны используются грибами хуже спиртов.

Жиры (триглицериды жирных кислот) хорошо усваиваются целым рядом грибов, предварительно расщепляющих их на жирную кислоту и глицерин липазами. Из продуктов расщепления жиров грибы раньше всего потребляют глицерин, а потом уже жирные кислоты: пальмитиновую, стеариновую и олеиновую. Жирнокислотные компоненты жиров очень хорошо используют сапролегниевые грибы (например, *Leptomitius lacteus*), что связано с их экологией, поскольку они расщепляют в основном субстраты животного происхождения, а также *Penicillium chrysogenum* и ряд других видов рода *Penicillium*.

Близок по строению к жирам воск — сложный эфир мирицилового спирта и пальмитиновой кислоты. Использовать его как источник углерода может *Aspergillus niger*, часто являющийся разрушителем пчелиных сотов. Представители семейства Aspergillaceae могут также питаться парафином, но лучше они усваивают углеводы.

Хорошо растут на среде с парафиновыми углеводородами некоторые дрожжи, которые служат для получения кормового белка, применяемого в животноводстве. Способность использовать для питания углеводороды свойственна и ряду гифообразующих поч-

венных грибов: муковыми из родов *Absidia*, *Mortierella*, *Cunninghamella*, *Mucor*, видам родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spicaria* и *Trichoderma*, которые усваивают углеводороды нефтепродуктов (Билай, Коваль, 1980).

Грибы, расщепляющие углеводороды, разрушают горючее и смазки, являются причиной закупорки масло- и бензопроводов, что может вызывать воздушные аварии, коррозию деталей самолетов и других машин. Из карбюраторов самолетов была выделена культура *Cladosporium resinae*, устойчивая к углеводородам с высоким октановым числом и способная развиваться на них как на единственном источнике углерода (Nicot, Zakartchenko, 1966). Участие углеводородов в обмене грибов подтверждается обнаружением их среди продуктов метаболизма. Так, например, из хламидоспор *Ustilago maydis*, *U. nuda* и *Sphacelotheca reiliana* было выделено соответственно 42, 56 и 146 видов алканов, представленных нормальными парафинами с длиной цепи от 14 до 37 атомов углерода. Подобные же углеводороды выделены из спор видов *Puccinia*, хламидоспор *Tilletia* и спор целого ряда других грибов (Weete, 1980).

Исследование углеродного питания можно использовать для целей таксономии. Так, Курсанов упоминал о *Saccharomyces globosus*, не содержащем инвертазы и не использующем сахарозу, который употреблялся для изготовления сладких вин. Недоброд сахара при применении этого вида составлял 20—25%, а содержание спирта в вине порядка 6—7%.

В отношении углеводного питания различаются между собой не только виды грибов, но также их расы и штаммы. Выделенные из различных сортов хлопчатника штаммы возбудителя вилта *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* отличались друг от друга не только по морфологическим признакам, но и по способности использовать различные сахара. Штамм F₃ использовал лучше фруктозу, тогда как штамм F₁ — мальтозу. Таким образом, физиологические критерии следует использовать в таксономии для изучения филогенетических связей очень осторожно, поскольку огромное значение для формирования сходных потребностей в питании имеет сходная экология. Например, как было установлено, из четырех дереворазрушающих грибов (аскомицетов *Xylaria digitata* и *Hypoxylon rubiginosum*, базидиомицетов *Polyporus cinnabarinus* и *P. conchifer*) по питанию источниками азота и углерода *P. cinnabarinus* оказался ближе к *H. rubiginosum*, чем к *P. conchifer* (Rajagopalan, 1965).

Углеводы играют роль не только в процессах роста грибов, но и как стимуляторы прорастания спор и как индукторы биосинтеза адаптивных ферментов. У базидиомицета *Schizophyllum commune* сахарные спирты активируют прорастание спор в течение экспозиции 30—60 мин, а большая часть сахаров и гликоген в течение 15—20 ч. Лаг-фаза для прорастания спор этого гриба в присутствии лактозы, сорбозы, раффинозы, трегалозы и мелибиозы составляла от 30 ч до 7 дней, а в присутствии галактозы, инозита,

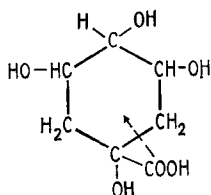
инулина, рамнозы, фукозы и органических кислот базидиоспоры не прорастали даже после 7 дней инкубации (Niederpruem, Dappen, 1966). В качестве индукторов адаптации ферментативной активности в отношении целлюлитических энзимов у 70 исследованных дереворазрушающих грибов могут служить целлобиоза и лактоза, особенно активные в присутствии дрожжевого экстракта, а также некоторые белки (Johnson, 1966). Ароматические соединения, даже содержащие 6 атомов углерода, усваиваются очень слабо.

Из соединений углерода наиболее простого строения грибы могут усваивать углекислоту. Однако единственным источником углерода для гетеротрофных по типу их питания грибов CO_2 , видимо, служить не может. Она усваивается только в процессе определенного этапа углеродного обмена при переходе от гликолитического цикла к циклам ди- и трикарбоновых кислот или жирных кислот, включаясь в фосфоэнолпируват при образовании оксалацетата или в ацетальдегид при образовании малоновой кислоты.

Усвоение CO_2 грибами было впервые показано с помощью изотопного метода Фостером (1941) на моделях *Rhizopus nigricans* и *Aspergillus niger*. Из усвоенной грибом при росте на среде с 5% глюкозы в замкнутом сосуде $^{14}\text{CO}_2$ более 1/3 ее оказалось в составе мицелия, а в анаэробных условиях 25% в образованной им фумаровой кислоте (Лилли, Барнетт, 1953; Фостер, 1950). Показана также способность усваивать углекислоту у *Blastocladiella pringsheimii* и у дереворазрушающего гриба *Coniophora cerebella*. Усвоение углерода из CO_2 воздуха меланинсодержащими грибами рода *Cladosporium* рассмотрено в работе Н. Н. Ждановой и др. (1985).

2. Общие данные об углеродном обмене грибов

Общие представления об интенсивности углеродного обмена у грибов были получены С. П. Костычевым (Kostytschew, 1904) на модели *A. niger*, растущего на среде с источником углерода в форме хинной кислоты, которая является у бактерий и *Neurospora crassa* промежуточным продуктом при синтезе ароматических аминокислот. Она легко расщепляется по связи между первым и вторым атомами углерода, переходя при этом в соединение, близкое по структуре к сахарным кислотам, хорошо потребляемым грибами:



Хинная кислота

Костычев обнаружил, что двухдневная культура *A. niger* за сутки выделяет 350% CO₂ от массы ее сухого мицелия. Так как доля углерода в углекислоте составляет около 1/3 от ее молекулярной массы, то продуктивность дыхания составляет

$$\frac{3,5 \text{ кг} \times 2}{3} = 2,3 \text{ кг}$$

углерода на 1 кг массы сухого мицелия в сутки. Учитывая, что половина используемых *A. niger* углеродов уходит на обеспечение биосинтетических процессов в течение роста мицелия, при отнесении его к начальной массе мицелия потребление сахара на чисто энергетические процессы при полном его окислении еще более возрастает.

При затратах большого количества материала для энергетических процессов у грибов экономический коэффициент, т. е. отношение массы сухого мицелия к общему количеству использованного сахара, редко оказывается больше 50%. При росте в разбавленных питательных средах он обычно колеблется от 20 до 40%, при росте на средах с 10—20% сахара часто падает до 10%.

Экономический коэффициент нередко выражают в форме пересчета данных на углерод мицелия и углерод использованного углевода. В этом случае он обычно бывает ниже приведенного ранее, так как количество углерода в мицелии обычно бывает ниже, чем в углеводах (Perlman, 1965).

Низкие экономические коэффициенты выгодны для бродильной промышленности, поскольку ее задачи сводятся к получению продуктов сбраживания углеводов, а не массы клеток продуцента.

Таблица 3.1

Соотношение между экономическим коэффициентом и коэффициентами превращения использованного углерода в углерод мицелия и лимонной кислоты в культуре *A. niger* (Perlman, 1965)

Дни ферментации	Определение экономического коэффициента			Определение коэффициента превращения		
	образованный мицелий, г	использованная глюкоза, г	экономический коэффициент	углерод использованного сахара, г	углерод лимонной кислоты, г	коэффициент превращения углерода глюкозы: С мицелия/С лимонной кислоты
4	0,375	2,64	14	0,95	0,60	17/63
7	0,676	8,78	8	2,92	2,18	9/74
10	0,825	12,12	7	4,17	3,19	8/76

Данные о соотношении экономического коэффициента и коэффициента превращения при лимоннокислом брожении с применением *A. niger* приводятся в табл. 3.1, где можно видеть, как коэффициент превращения нарастает в процессе ферментации.

На уровень экономического коэффициента и коэффициента превращения у грибов могут влиять особенности культуры, ее биохимическая активность и возраст, а также условия среды — температура, аэрация, концентрация используемого углерода, характер источника азота и влияние ионов металлов (Perlman, 1965).

На примере штаммов *A. niger*, продуцирующего лимонную кислоту, можно видеть влияние на экономический коэффициент их наследственных свойств и возраста культуры. С увеличением возраста экономический коэффициент падает, причем особенно заметно у слабоактивного штамма — продуцента лимонной кислоты. У более активного штамма экономический коэффициент сохраняется примерно на постоянном уровне и оказывается ниже, чем у слабоактивного. Слабоактивный штамм расходует используемый им сахар в основном на образование мицелия, сильноактивный — на продукцию лимонной кислоты (Perlman, 1965).

Энергетические соотношения при углеродном обмене иногда выражаются также в термодинамической форме в виде коэффициента Рубнера, представляющего собой отношение теплоты сжигания выросшего мицелия в килокалориях на грамм сухого вещества к теплоте сжигания потребленного источника углерода в килокалориях на грамм, выраженное в процентах. Для *A. niger* при использовании в качестве источника углерода глюкозы коэффициент Рубнера достигает 48%, глицерина — 37 и этилового спирта — 28%. Коэффициент Рубнера обычно оказывается выше экономического коэффициента, поскольку специфическая теплотворная способность мицелия грибов, составляющая 4,8 ккал/1 г веса, больше, чем, например у глюкозы, теплотворная способность которой достигает только 3,76 ккал/1 г веса (Фостер, 1950).

3. Основной обмен соединений углерода у грибов

Основным обменом называют этапы обмена веществ, необходимые для поддержания жизни, роста и размножения организмов. Главной чертой его является менее выраженная специфичность по сравнению с боковыми путями обмена. Он, в общем, сходен у всех живых существ и чаще отличается лишь некоторой возрастной специфичностью. Например, эмбриональные ткани получают энергию преимущественно через гликолитический путь Эмбден — Мейергофа — Парнаса (ЭМП), тогда как более зрелые характеризуются более развитым пентозным циклом или циклом гексомонофосфата (ГМФ).

В качестве примера этого положения из области грибов могут служить прорастающие хламидоспоры *Ustilago maydis*, которые через 12 ч после начала их прорастания еще не имеют энзимов для усвоения сахаров через путь ГМФ и ферментов цикла Кребса, но уже обладают комплексом энзимов, участвующих в усвоении сахаров по пути ЭМП (Blumental, 1965). В спорах *Tilletia caries* имеется только серия энзимов для метаболизма сахаров по пути

Энтнер — Дудорова (ЭД), в котором отсутствует фосфорилирование глюкозы, тогда как в мицелии вместо них обнаруживаются энзимы, действующие при метаболизме сахаров через пути ЭМП и ГМФ.

У больших таксономических групп, стоящих на сильно удаленных друг от друга ступенях филогенеза, степень развития отдельных этапов основного обмена может также довольно резко отличаться. Например, у оомицетов цикл Кребса, видимо, развит слабо, так как они используют предпочтительно для питания уже готовые аминокислоты. У паразитов часто выявляются вторичные дефекты, связанные с паразитарным образом жизни.

Хотя у грибов и встречаются исключения экологического происхождения в форме сильных изменений первых этапов основного обмена, например сильное преобладание в обмене *Caldariomyces fumago* редко встречающегося типа гликолиза по пути ЭД, однако основной обмен меняется реже в зависимости от экологических условий, чем его боковые пути. Он обычно не имеет видовой или групповой специфичности, характерных для узких таксономических групп грибов, обитающих в сходных экологических условиях. Видовая или групповая специфичность обмена проявляется чаще всего в закрепленных филогенетически приспособлениях, развившихся в результате экологических воздействий в боковых ветвях метаболизма, необязательных для роста и развития, накопления биомассы и деления клеток, но необходимых для приспособления к среде обитания, как например, образование антибиотиков, токсинов, витаминов, ферментов специального назначения, чаще всего гидролитических и других специфических продуктов метаболизма.

Пути гликолиза у грибов. В настоящее время исследовано четыре вида путей гликолиза у грибов, являющихся первыми этапами их углеродного обмена. Эти пути следующие: путь ЭМП, путь ГМФ или пентозный (апотомический) цикл, путь ЭД и глюкуро-натксилулозный (ГК). Не исключается открытие и новых путей гликолиза у грибов.

Путь ЭМП, который был изучен первым и оказался наиболее широко распространенным, характерен промежуточным метаболизмом через образование на первом этапе фруктозо-1,6-дифосфата (рис. 3.1). На втором и параллельном ему третьем этапах происходит дальнейшая трансформация триоз, полученных после действия альдолазы.

Пировиноградная кислота — конечный продукт процесса гликолиза — включается далее в метаболизм цикла ТКК. Однако еще не доходя до цикла ТКК, у многих грибов пировиноградная кислота может восстанавливаться при помощи НАДН₂-дегидрогеназы до молочной кислоты. Это превращение носит название молочнокислого брожения.

Четвертый этап составляет превращение пировиноградной кислоты при действии декарбоксилазы с кофактором тиаминпиродифосфатом (ТПФ) в ацетальдегид и далее при действии НАДН₂-дегидрогеназы в этиловый спирт и носит название спиртового брожения.

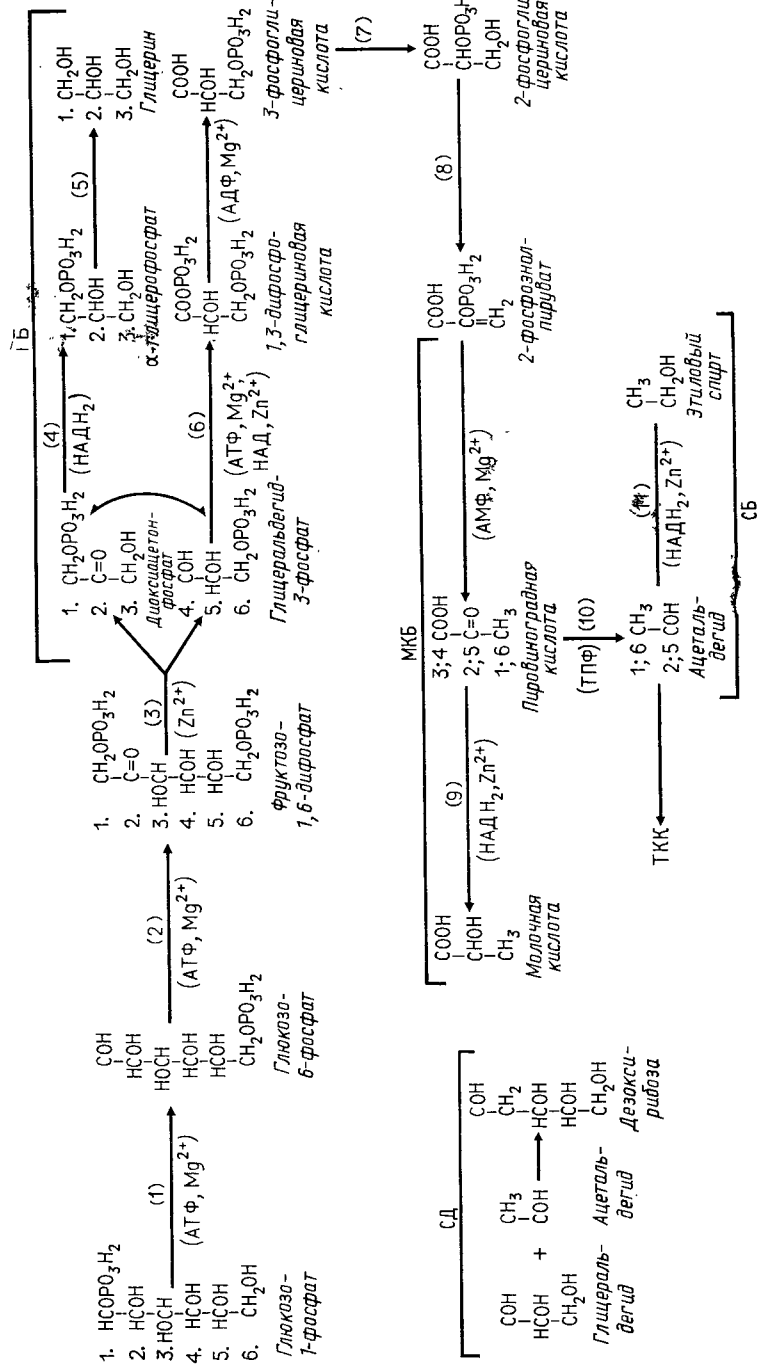


Рис. 3.1. Метаболизм глюкозы через путь ЭМП. Участвующие в цикле ЭМП ферменты: 1 — гексокиназа; 2 — фосфофруктокиназа и глюкозофосфатизомераза; 3 — альдолаза; 4 — диоксиацетонфосфатдегидрогеназа; 5 — глицирофосфатаза; 6 — глициральный-3-фосфатдегидрогеназа; 7 — фосфоглицераткиназа; 8 — энолаза (фосфоэнолпируватгидратаза); 9 — козимаза; 10 — козимаза. Кофакторы ферментов показаны в местах их действия. Распределение атомов углерода по — декарбонизации; 11 — козимаза.

Пятая трансформация в пределах пути ЭМП — это образование путем конденсации ацетальдегида и глицеральдегида сахарного компонента ДНК — дезоксирибозы, очень необходимой для основного обмена нуклеиновых кислот.

Путь гликолиза через ГМФ, или пентозный цикл, осуществляется через образование из глюкозы на первом этапе глюконолактона и из него глюконовой кислоты (рис. 3.2).

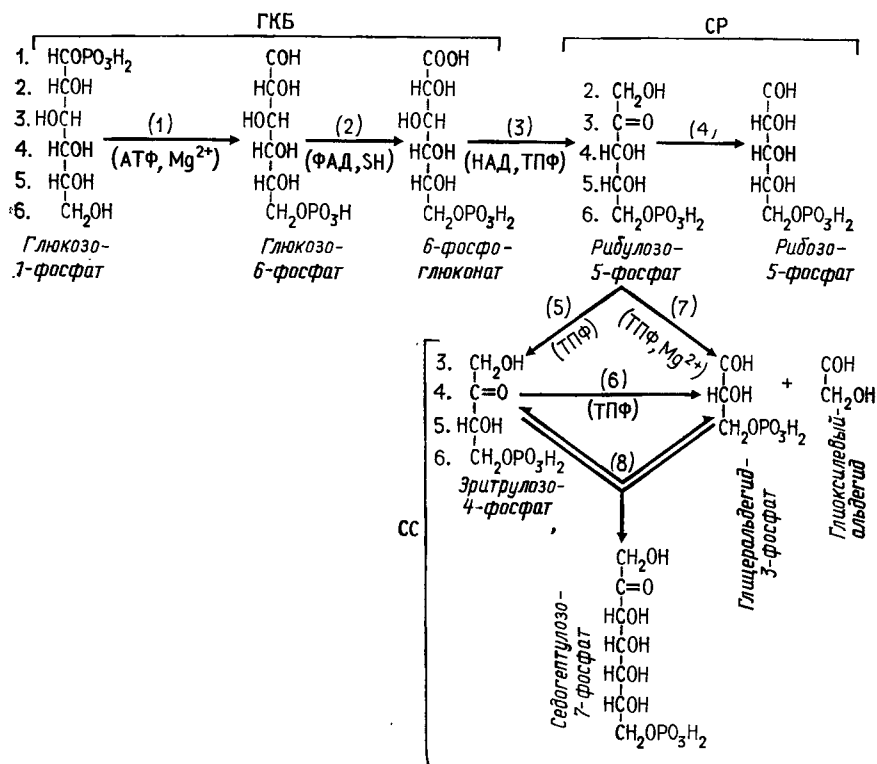


Рис. 3.2. Метаболизм глюкозы через путь ГМФ, или пентозный цикл. Участвующие в пути ГМФ ферменты: 1 — гексокиназа; 2 — глюкозофосфатоксидоредуктаза; 3 — фосфоглюконатдегидрогеназа и декарбоксилаза; 4 — рибулозо-5-фосфатизомераза; 5 — рибулозо-5-фосфатдекарбоксилаза; 6 — эритроулозо-4-фосфатдекарбоксилаза; 7 — транскетолаза; 8 — трансальдоллаза или транскетолаза.

Распределение атомов углерода глюкозы обозначено порядковыми номерами

Второй этап пентозного цикла состоит в трансформации рибулозо-5-фосфата по двум альтернативным путям (рис. 3.2). Фермент транскетолаза, способный переносить с одного сахара на другой двухфрагментные группы углеродных соединений, содержащие кетогруппу, очень типичен для пути ГМФ.

Третий этап пентозного цикла состоит в конденсации с помощью трансальдолазы эритроулозо-4-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата

в сахар седогептулозу, функционирующую как резервный источник для образования серии сахаров с различным числом атомов углерода. Седогептулоза может образовываться также путем переноса двууглеродного фрагмента транскетолазой на пентозу. Возможны и другие перекомбинации, осуществляемые транскетолазой и трансальдолазой.

Цикл метаболизма по пути ГМФ распространен почти так же широко, как и цикл ЭМП, и имеет весьма разнообразное назначение, поскольку: 1) он необходим для образования рибозы, а следовательно, для синтеза РНК, 2) с его помощью создаются запасы разнообразных сахаров, пригодных для дальнейших перестроек (седогептулоза) и синтезов, 3) он обеспечивает материалом биосинтезы ароматических аминокислот из эритрозо-4-фосфата.

Путь метаболизма глюкозы по Энтнер — Дудорову был обнаружен в связи с выявлением видов грибов, совершенно лишенных фосфогексокиназы, фермента фосфорилирующего гексозы. *Caldariomyces fumago* и прорастающие споры головки *Tilletia caries*

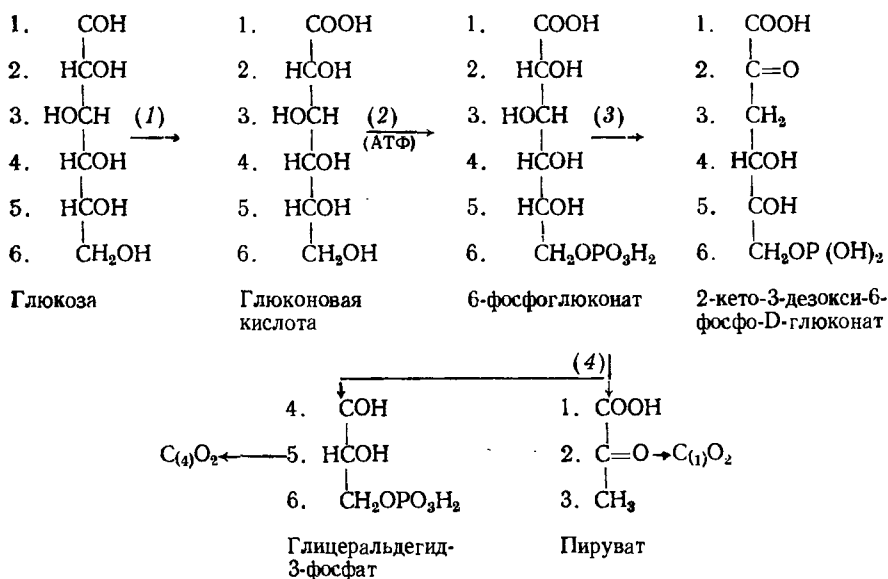


Рис. 3.3. Метаболизм глюкозы через путь ЭД и распределение в его продуктах атомов углерода этого моносахарида (обозначены порядковыми номерами). Участвующие в пути ЭД ферменты: 1 — глюкозооксидаза; 2 — глюконаткиназа; 3 — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 4 — 2-кето-3-дезоксиглюконатальдолаза (Blumental, 1965)

оказались способными окислять нефосфорилированную глюкозу в глюконовую кислоту с помощью глюкозооксидазы и фосфорилировать уже глюконат при действии глюконаткиназы (рис. 3.3). Конечные продукты цикла ЭД могут далее включаться в циклы

ЭМП и ГМФ, а также в цикл трикарбоновых кислот. Этот путь метаболизма углеводов встречается у грибов сравнительно редко.

Глюкуронат-ксилоулозный путь метаболизма углеводов заключается в окислении глюкозы в глюкуроновую и далее гулоновую кислоту, дающую затем начало аскорбиновой кислоте (рис. 3.4). D-рибулозо-5-фосфат может включаться в цикл ГМФ.

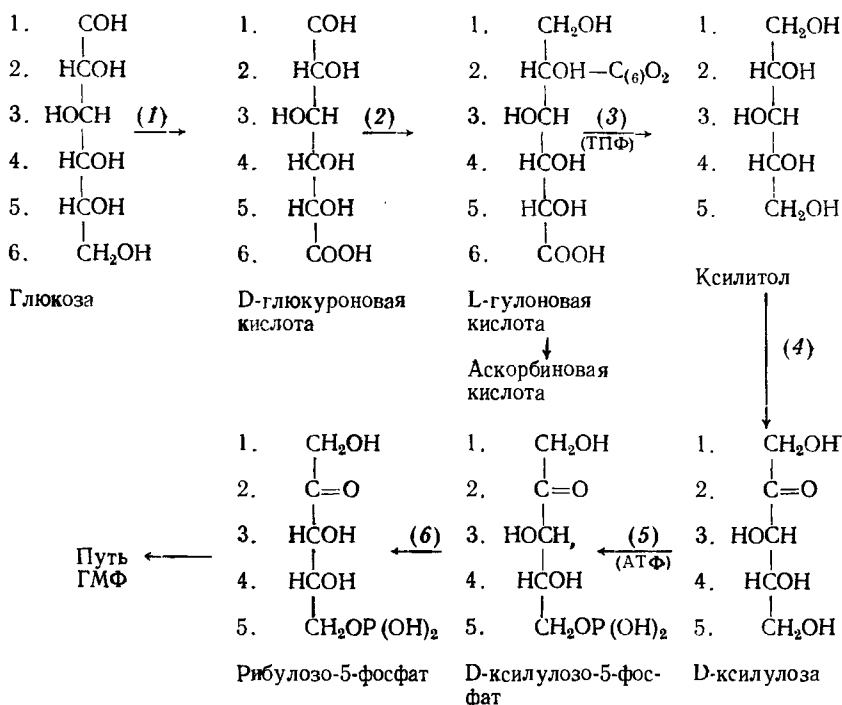


Рис. 3.4. Метаболизм глюкозы через глюкуронат-ксилоулозный путь и распределение в продуктах метаболизма ее атомов углерода (обозначены порядковыми номерами). Участвующие в пути ГК энзимы: 1 — глюкозодегидрогеназа; 2 — глюкуронатредуктаза; 3 — гулонатдекарбоксилаза; 4 — ксилитолдегидрогеназа; 5 — фосфокиназа; 6 — изомеразы (Blumental, 1965)

Этот путь метаболизма имеется у *Aspergillus niger*, так как добавление в его культуру глюкуронолактона вызывает у него увеличение количества аскорбиновой кислоты втрое, выход которой составляет 2,6%. Рост мицелия при этом увеличивается всего на 18% (Sastri, Sarma, 1957). Количественное значение этого пути метаболизма пока еще не изучено и, вероятно, он является «минорным», поскольку объем его невелик. Тем не менее значение его в обмене важно как ведущего к образованию аскорбиновой кислоты. Кроме *A. niger* он, видимо, функционирует также у *Penicillium chrysogenum* и у дрожжей.

Описанные здесь четыре типа гликолитических процессов, вероятно, еще не исчерпывают всего разнообразия первых этапов

углеродного метаболизма грибов. Например, известен в настоящее время путь окисления галактозы в галактуроновую кислоту, далее трансформирующуюся в галактодиальдозу. Такой путь окисления был обнаружен у дереворазрушающего базидиомицета *Polyporus circinatus* (Blumental, 1965). Вероятно, его обнаружения следует ожидать и у других видов.

Между отдельными путями гликолиза имеется связь, позволяющая обойти через включение альтернативных путей обмена затруднения из-за дефицита какого-либо фермента. Например, дефицит включающейся в обычный путь ЭМП гексокиназы у *Caldariomyces fumago* компенсируется возможностью исходить из образующегося без фосфорилирования глюкозы 6-фосфоглюконата или 2-кето-6-фосфоглюконата с последующим включением продуктов обмена в путь ЭМП или ГМФ (рис. 3.5).

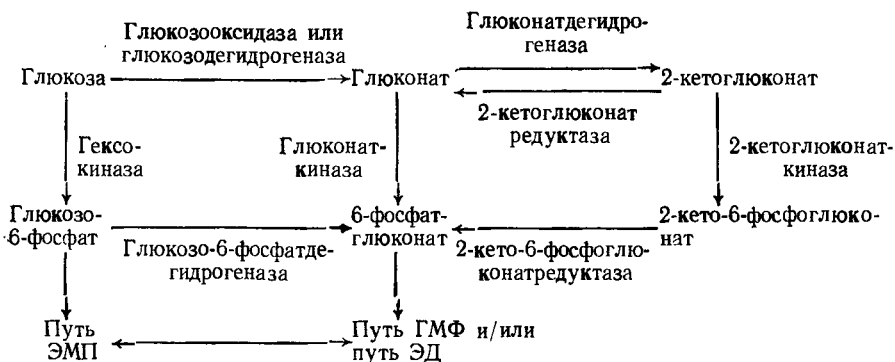


Рис. 3.5. Взаимосвязь различных путей метаболизма гексоз и гексоновых кислот у грибов (Blumental, 1965)

Количественное соотношение разных путей гликолитического обмена у различных грибов отличается друг от друга, но большей частью у них преобладает путь ЭМП. Путь ГМФ известен как ведущий, или равноценный пути ЭМП, у немногих видов, например *Penicillium charlesii*, *P. urticae*, *Ustilago maydis*, *Tilletia contraversa* и у ряда актиномицетов.

Путь ЭД известен пока только у двух видов: *C. fumago* и *T. caries*. Однако возможно, что впечатление о преобладании в гликолитическом обмене пути ЭМП является результатом краткосрочных опытов или других условий культивирования, так как есть сведения, что путь ГМФ развивается позднее, чем путь ЭМП, в процессе дифференцировки вегетативного мицелия.

Преобладание тех или иных путей гликолиза может очень сильно зависеть от композиции питательной среды и степени доступности необходимых для гриба энергодающих систем, минеральных компонентов, микроэлементов или витаминов. В частности, это, видимо, сильно связано с относительными концентрациями серы и фосфора в среде. Поскольку путь ЭМП основан на образовании

двукратно фосфорилируемых соединений, как глюкозо-1,6-дифосфат и фруктозо-1,6-дифосфат, для него требуется более интенсивное снабжение фосфатом. Напротив, для пути ГМФ, по которому фосфорилирование протекает только однократно при образовании глюкозо-6-фосфата, фосфора требуется меньше, но зато необходимо повышенное снабжение сульфатом ввиду участия в нем SH-групп и тиамина.

Из работы Дмитриевой (1967) на примере *Penicillium chrysogenum* следует, что сдвиг баланса P : S в пользу фосфора приводит к замедлению развития мицелия, видимо, сопровождаемому преобладанием пути ЭМП, а сдвиг его в пользу серы — к ускорению развития с очевидным преобладанием в гликолитическом обмене пути ГМФ. Косвенными гистохимическими доказательствами наличия метаболизма по пути ЭМП при избытке фосфора в среде являются большое накопление в клетках мицелия *P. chrysogenum* волютина, состоящего из полифосфатов, и стимуляция синтеза ДНК, выражающаяся в учащении деления ядер. Усиление обмена ДНК объясняется синтезом по пути ЭМП дезоксирибозы, которая является одним из факторов, лимитирующих биосинтез этой нуклеиновой кислоты, а накопление полифосфатов сигнализирует о высоком уровне фосфорилирования и расхода фосфорной кислоты в обмене (рис. 3.6).

Подтверждением преимущественного метаболизма по пути ГМФ при избытке серы в среде является преобладание в мицелии продуцента пенициллина волютина, состоящего из РНК, что связано с усилением синтеза рибозы, одного из важнейших факторов, регулирующих биосинтез рибонуклеиновой кислоты. Это совпадает с одновременной значительно большей продукцией серосодержащего антибиотика *P. chrysogenum* — трипептида пенициллина, включающего в состав молекулы цистеин. В условиях нормального оптимального баланса P : S состояния мицелия, характерные для преобладания фосфора в среде и для сдвига баланса в пользу серы, последовательно сменяют друг друга в онтогенезе, что указывает на связь пути ГМФ (по мнению биохимиков, филогенетически более позднего) с возрастной дифференциацией и развитием экологических приспособлений в форме продукции антибиотика.

Сходные явления наблюдались и у актиномицетов, продуцентов тетрациклинов, например у *Streptomyces rimosus*. Низкая продуктивность сопровождалась у него угнетением цикла ГМФ, выражающимся в падении активности фосфоглюконатдегидрогеназы, и усилением пути обмена по ЭМП, о чем можно было судить по усилению активности его энзимов и по накоплению пирувата в среде.

Энергетическое значение путей гликолиза относительно невелико. Общее их назначение состоит в основном в подаче метаболитов для дальнейших биосинтезов, необходимых для нормального обмена. Вещества эти могут быть следующими: 1) составляющие фрагменты, необходимые для синтеза клеточных оболочек: глюкозамин-6-фосфат или УДФАГ для биосинтеза хитина, УДФ-глю-

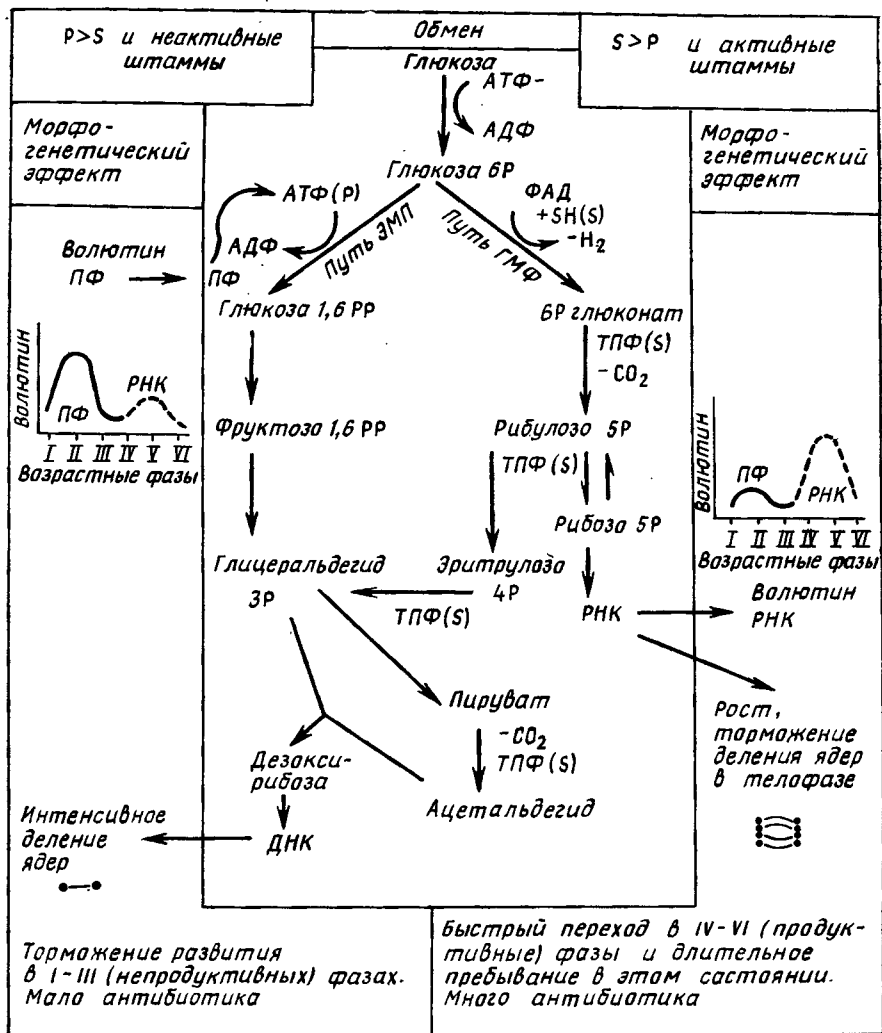


Рис. 3.6. Связь морфогенеза, гликолитического обмена и активности пенициллина в погруженной культуре *Penicillium chrysogenum* с преобладанием фосфора или серы в среде

коза для биосинтеза глюканов, гликогена и клетчатки, манноза при синтезе маннана, сахара, участвующие в первых этапах гликолиза; 2) пентозы, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот: дезоксирибоза для биосинтеза ДНК, образующаяся по пути ЭМП, рибоза для биосинтеза РНК, образующаяся по пути ГМФ; 3) запасные вещества для эндогенного получения энергии: УДФ-глюкоза, гликоген, жиры, глицерин и ацетальдегид; 4) метаболиты

для синтезов в пределах цикла трикарбоновых кислот: ацетальдегид и пируват — источники для биосинтеза аминокислот и белка; 5) метаболиты для синтеза ароматических аминокислот: эритролезо-4-фосфат, синтезирующийся по пути ГМФ; 6) метаболиты для биосинтеза терпенов, жиров и ароматических соединений, не содержащих азота, и т. д., такие как пируват, ацетальдегид и некоторые вещества, образующиеся по пути ГМФ.

Гликолитические пути метаболизма слабо функционируют как источники энергии, так как выход энергии в них в 20—30 раз ниже, чем в дыхательной цепи, связанной с циклом Кребса. Они играют в основном конструктивную роль в обмене веществ, поставляя разнообразные низкомолекулярные фрагменты для обеспечения различных более сложных синтезов в процессе роста и развития живых организмов, в том числе и для многочисленных боковых путей обмена, лежащих в основе их приспособлений к среде обитания.

Цикл ди- и трикарбоновых кислот Кребса. Необходимость этапа основного обмена через цикл Кребса обусловлена тем, что он дает основной материал для синтеза протеина, нуклеиновых кислот (пуринов и пиримидинов) и различных кофакторов ферментов белков, т. е. витаминов. Реакции цикла Кребса широко распространены среди грибов. Они установлены у 51 вида из всех основных классов грибов (Niederpruem, 1965), но интенсивность его функционирования различна у разных представителей этого царства. Также, видимо, не у всех форм грибов представлены все реакции цикла ТКК.

Была сделана попытка связать распространение этого обмена с филогенией грибов. При этом обнаружилось, что среди низших грибов более примитивные одногугитиковые формы характеризуются гомоферментным обменом, т. е. образуют большей частью из глюкозы молочную кислоту, и имеют слабо функционирующий цикл ТКК. Исключение составляет только род *Allomyces* — выраженный аэроб с сильно развитым циклом Кребса. Однако двугугитиковые оомицеты из семейств Saprolegniales и Leptomicetales тоже слабо образуют органические кислоты, формирующиеся в цикле ТКК.

Исследование обмена по циклу Кребса у грибов проводится теми же путями, что и при изучении процесса гликолиза. Оценка по анализу ферментативных систем цикла ТКК затрудняется тем, что большинство его ферментов, в противоположность ферментам путей гликолиза, находящимся в цитоплазме, локализуется в органоидах клетки — митохондриях, легко разрушающихся при их изоляции в бесклеточных экстрактах грибов. При работе с этими ферментами потребовалась разработка специальных мягких методов выделения митохондриальных фракций клеток и последующего отделения ферментов от структурных белков митохондрий, с которыми они связаны, без потери их активности. Для этого было применено быстрое механическое разрушение клеток в подходящем растворителе, заключение их в раствор сахарозы, препятствующий набуханию митохондрий, удаление вредных металлов и т. д. Дыхательные гранулы из митохондрий, активно дышащие и крася-

щиеся гН-индикаторами, например янусом зеленым, были выделены из *Allomyces macrogynus*, *Candida albicans*, *Fusarium lini*, *Aspergillus oryzae*, *Myrothecium oxysporum*, *Neurospora crassa* и ряда других грибов (Niederpruem, 1965). У *A. macrogynus* и *A. oryzae* были также выделены митохондрии, способные производить окислительное фосфорилирование.

Последовательность реакций цикла дикарбоновых и трикарбоновых кислот (ТКК) или цикла Кребса помещена на схеме рис. 3.7.

В первом этапе с помощью конденсирующего энзима в молекулу фосфоэнолпирувата включается молекула углекислоты, в результате чего образуется оксалацетат с четырьмя атомами углерода.

Второй этап состоит в конденсации оксалацетата с ацетильной группой с образованием шестиуглеродной лимонной кислоты. Кофакторами этой синтетазы являются коэнзим А, ионы K^+ и Mg^{2+} . Цитратсинтаза была выделена из *Aspergillus niger* и из дрожжей, но у *A. niger* она несколько отличалась от дрожжевой, так как не стимулировалась, а угнеталась ионами Mg^{2+} .

В третьем этапе цикла ТКК происходят внутренние перестройки, приводящие к преобразованию цитрата сначала в цисаконитовую, а затем в изолимонную кислоту. Оба этих этапа полностью обратимы. В первом из них может участвовать высокомолекулярная аконитгидратаза, не активируемая ионами Fe^{3+} и SH-группами. Тот же процесс трансформации цитрата в цисаконитат и обратно и последующий из цисаконитата в изоцитрат может осуществлять и другой низкомолекулярный фермент — аконитаза, активируемая ионами Fe^{3+} и SH-группами.

В четвертом этапе цикла Кребса изоцитрат окисляется изоцитратдегидрогеназой в оксалсукцинат. Кофакторами этого фермента являются НАДФ и металлы Mn^{2+} или Mg^{2+} . При этом происходит первый сброс двух атомов водорода в дыхательную цепь с выходом энергии.

В пятом этапе цикла ТКК происходит декарбоксилирование оксалсукцината с участием связанной с НАД, НАДФ, Mn^{2+} или Mg^{2+} изоцитратдегидрогеназы, приводящее к образованию пятиуглеродной α -кетоглутаровой кислоты. Производящий эту трансформацию фермент был изучен у дрожжей и у *A. niger*, у которого он связан с НАД и более лабилен в отношении температуры. Ферменты этого этапа тесно связаны с митохондриями и требуют для поддержания их активности присутствия АТФ или ортофосфата. Образующийся в этом этапе α -кетоглутарат при его аминировании дает начало образованию глутаминовой кислоты, включающейся далее в синтез белков. Однако при недостатке восстановленных форм азота α -кетоглутаровая кислота метаболизируется далее.

Шестой этап трансформации метаболитов цикла ТКК состоит в декарбоксилировании α -кетоглутарата и одновременной конденсации образовавшегося сукцината с коэнзимом А. Эта реакция осуществляется с помощью α -кетоглутаратдегидрогеназы, производящей окислительное декарбоксилирование при участии в каче-

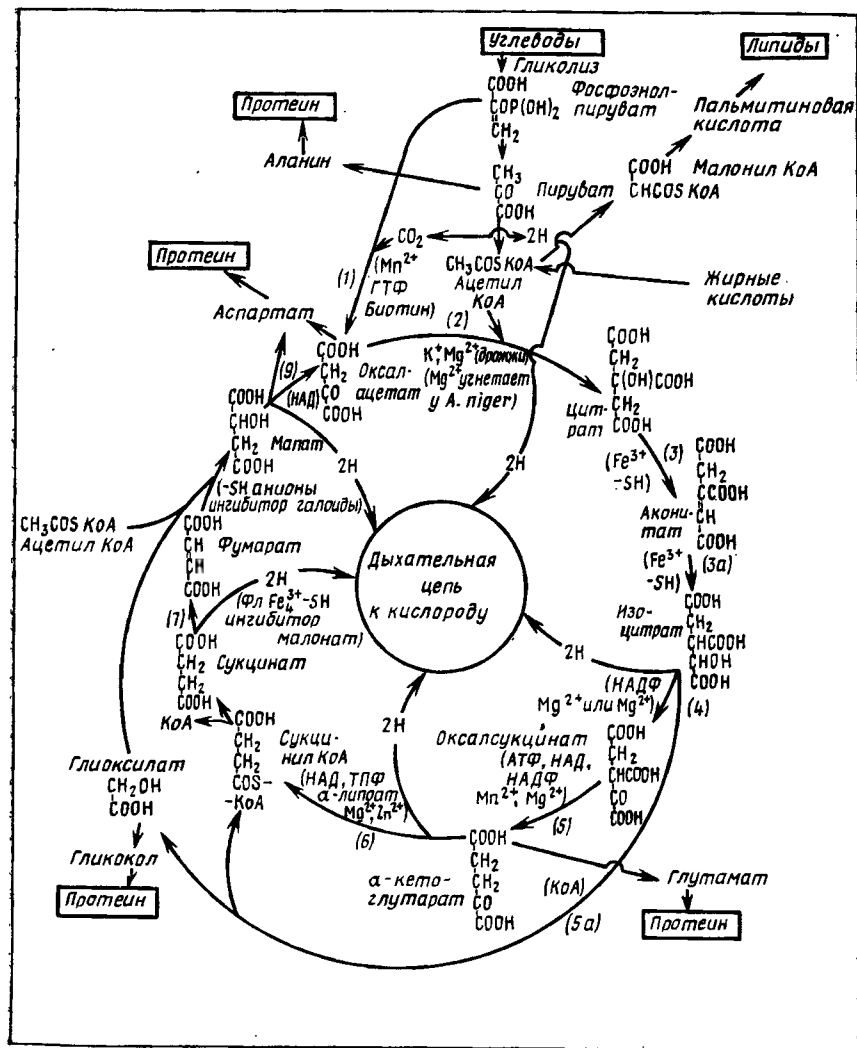


Рис. 3.7. Цикл Кребса (модификация, составленная по данным Niederpruem, 1965). В скобках приведены кофакторы и стимуляторы активности данного энзима. Участвующие в цикле Кребса энзимы: 1 — пируваткарбоксилаза; 2 — цитратсинтаза; 3 — аконитаза; 3a — аконитгидратаза; 4 — изоцитратдегидрогеназа; 5 — изоцитратдекарбоксилаза; 5a — изоцитратаза; 6 — α-кетоглутаратдегидрогеназа; 7 — сукцилатдегидрогеназа; 8 — фумараза; 9 — малатдегидрогеназа

стве кофакторов Mg^{2+} , Zn^{2+} , ТПФ, НАД, α-липоевой кислоты и КоА, содержащего SH-группу. При этом происходит освобождение энергии, сопровождающее второй сброс в дыхательную цепь двух атомов водорода и образование четырехуглеродного метаболита

(сукцината) в цикле ТКК. Поскольку производящий эту реакцию фермент имеет в своем составе КоА и, следовательно, SH-группы, при утрате им активности под влиянием арсенида она может быть возвращена при действии тиоловых соединений. Ферменты этого этапа также содержатся в митохондриях и были получены из мицелия *A. niger* (Ramakrishnan, 1954, цит. по Niederpruem, 1965).

В следующем, седьмом, этапе цикла ТКК сукцинил коэнзим А трансформируется в сукцинат и с помощью сукцинатдегидрогеназы, содержащей в качестве кофакторов флавиновый нуклеотид, 4 молекулы негемового Fe^{3+} на молекулу энзима и SH-группы, трансформируется в фумаровую кислоту. При этом происходит третий сброс двух атомов водорода в дыхательную цепь и третий случай освобождения энергии в процессе прохождения этого цикла. Сукцинатдегидрогеназа была получена в виде препарата 65% чистоты из дрожжей, а также была выделена из ряда грибообразующих грибов таких, как *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium chrysogenum* и *Claviceps purpurea*. Энизим из *C. purpurea* оказался сходным с соответствующим энзимом млекопитающих по оптимальной активности при pH 7,7 и конкурентному подавлению его фумаратом, пирофосфатом и малонатом. Однако в противоположность энзиму из млекопитающих, энзим из *Claviceps* мало реагировал на действие фосфата.

Восьмой этап цикла Кребса состоит в гидрировании фумаровой кислоты с помощью фумаразы и в превращении ее в яблочную кислоту (малат). Фермент фумаразы стимулируется двух- и трехвалентными анионами и SH-группами, но подавляется одновалентными анионами, такими как галоиды и CNS. Этот фермент был выделен из *A. niger* и из ряда дрожжей. У дрожжей *Candida utilis* он существует в двух формах с разным оптимальным pH для их активности. Обе формы удалось разделить с помощью электрофореза.

Последний, девятый, этап цикла ТКК состоит в окислении малата в оксалацетат, что осуществляется с помощью фермента малатдегидрогеназы, которая относится к дегидрогеназам α -гидроксикарбоксильных кислот и имеет в качестве кофактора НАД. Эта дегидрогеназа была получена в виде двестикиратно очищенного препарата из супериатанта гомогената клеток дрожжей, т. е., видимо, не связана с митохондриями. У *Neurospora crassa* были найдены четыре изоэнзима этого фермента (Niederpruem, 1965), а у *Uromyces phaseoli* (*U. appendiculatus*) найдено три таких изоэнзима в его уредоспорах. В этом этапе происходит последний, если не считать момента включения CO_2 в пируват, четвертый, сброс двух атомов водорода в дыхательную цепь.

Цикл глиоксилата, являющийся укороченным вариантом цикла ТКК, обнаруженным первоначально у бактерий, встречается также и у грибов, как у дрожжевых, так и у грибообразующих. Этапы обмена по глиоксилатному пути состоят в следующем (см. рис. 3.7).

Под влиянием фермента изоцитратазы, при одновремениом участии коэнзима А, происходит расщепление изолимонной кисло-

ты на сукцинил-КоА и глиоксилевую кислоту, содержащую сочетание карбоксильной и спиртовой групп, удобное для процессов конденсации. Сукцинил-КоА трансформируется далее по ходу цикла ТКК в сукцинат и фумарат, а глиоксилат конденсируется с помощью фермента малатсинтетазы с ацетил-КоА, что приводит к образованию яблочной кислоты. При этом отпадает необходимость в прохождении трех этапов цикла ТКК от изоцитрата до сукцинил-КоА и источник для образования аспарагиновой кислоты в форме малата пополняется сразу двумя путями: через путь сукцинат—фумарат—малат и через конденсацию глиоксилата с ацетил-КоА. Кроме того, возможен третий путь через восстановление оксалацетата.

Все это приводит к быстрому накоплению обильного материала для биосинтеза аспарагиновой кислоты, получающейся путем аминирования малата или оксалацетата и вовлекающейся далее в биосинтез белков. Значение метаболизма в пределах цикла Кребса для грибов так же, как и в случае других живых организмов, сводится к трем основным функциям.

1. Синтез «материнских», или первичных, аминокислот путем аминирования кето- и оксикислот, на основе которых далее синтезируются белки. Главнейшие из этих путей аминирования состоят в трансформациях: оксалацетат (или малат)-аспарагиновая кислота, α -кетоглутарат — глутаминовая кислота и, на пороге цикла ТКК и гликолиза, пируват—аланин, а также глиоксилат—глицин.

2. Получение энергии и реализация окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи, т. е. процесса запасаания энергии. Эта функция выполняется благодаря пятикратному сбрасыванию $2H^+$ в процессе окисления кислот цикла Кребса. Запас энергии накапливается при этом в форме АТФ или других макроэргических соединений и служит источником снабжения энергией всевозможных синтезов.

3. Звено цикла ТКК, в котором осуществляется усвоение CO_2 при образовании щавелевоуксусной кислоты, так же, как и включение CO_2 в ацетат при образовании малоната (в жировом обмене), может служить для пополнения в клетке запаса углерода, используемого в различных биосинтезах.

4. Боковые ветви обмена углерода

Как боковые ветви обмена углерода, заканчивающиеся биосинтезом и накоплением специфических веществ экологического или структурного назначения, могут функционировать и основные пути обмена, при условии блокирования дальнейшей трансформации промежуточных продуктов биосинтеза, накапливающихся в клетке или в культуре. Примером этого может служить накопление этилового алкоголя у дрожжей (спиртовое брожение) или молочной кислоты у мукоровых грибов или, наконец, маннита у видов рода *Aspergillus*. В основе этих боковых путей углеродного обмена лежит всего один дополнительный этап, состоящий в восстановлении

образующихся метаболитов и отвлекающий эти продукты из путей основного обмена.

Однако существуют специальные многоэтапные боковые пути биосинтеза, отобранные в процессе эволюции как важные экологические приспособления. Особенно много таких приспособительных биосинтезов существует в путях обмена жиров и терпенов. Как тот, так и другой пути исходят в основном из ацетата или, вернее, из ацетил-КоА.

Обмен жиров и образование полиэнов. Жирные кислоты и жиры имеют наиболее близкое отношение к основному обмену, так как являются структурными элементами клетки, обеспечивающими сохранение раздела сред почти во всех мембранных клеточных структурах (клеточные мембраны, митохондрии, аппарат Гольджи и т. д.). Видимо, липиды, а в особенности стероиды и фосфолипиды, являются не только запасными веществами, хотя и эту роль они тоже играют, а составляют компоненты структурных элементов клетки, обеспечивая определенные механизмы проницаемости, последовательность биохимических реакций и поддержку определенной структурной организации клеточных элементов. Особое значение они имеют для функционирования многочисленных мембранно-связанных энзимов.

Липиды занимают очень важное место в обмене грибов, это можно видеть уже из данных по их общему количеству (Weete, 1980), которое, с одной стороны, может достигать больших величин от сухой массы, а с другой — может сильно колебаться в зависимости от внешних условий и возраста культуры.

Особенно большие количества липидов находили у ряда муко-
ровых грибов (до 40—55%), у дерматофитов (45—56%), у неко-
торых рас дрожжей (до 65—87%) и у *Chaetomium globosum*
(54%). То, что при отдельных анализах их количество сильно
меняется, например, у *Claviceps purpurea* в 15 раз, а у *Tilletia*
nudus более чем в 200 раз и почти у всех муко-
ровых грибов в 10 раз, указывает на очень активное участие липидов в их
обмене веществ, сопровождающееся либо их синтезом, либо
распадом.

В составе липидов грибов и других организмов обычно разли-
чают шесть фракций: углеводороды, стеролы, их эфиры, жирные
кислоты, их глицериды и фосфолипиды, среди которых наиболее
мощные фракции у грибов составляют триглицериды жирных кис-
лот и фосфолипиды (Weete, 1980).

У отдельных таксономических и экологических групп соотно-
шение фракций может меняться (табл. 3.2). Например, почти
у всех дрожжей более важное место по сравнению с триглицери-
дами занимают эфиры стеролов, тогда как у исследованного пред-
ставителя оомицетов *Pythium ultimum* фосфолипиды уступают ме-
сто свободным жирным кислотам (см. табл. 3.2).

Принципиальная схема биосинтеза насыщенных жирных кислот
исходит из малоновой кислоты, точнее из малонил-КоА, образу-
ющегося из ацетил-КоА путем включения в него CO_2 , происходящего

Сравнение фракционного состава липидов грибов из разных таксономических групп (+++—30—60%; ++—10—30%; +—10%)

Таксономическая группа	Угле- водо- роды	Эфиры стеро- лов	Три- глице- риды	Жир- ные кис- лоты	Сте- ролы	Фос- фоли- пиды
Oomycetes (Peronosporales)	0	0	+++	++	0	+
Trichomycetes	0	+	++	+	++	++
Chitridiomycetes (Blastocladales)	+	+	+	+	+	+++
Zygomycetes (Mucorales)	0	0	+	+	++	+++
Ascomycetes	0	+++	+	+	+	++
Pyrenomycetes (Neurospora)	?	+	+++	+	+	+++
Deuteromycetes (Hyalosporae)	0	+	++	+	++	+++
Deuteromycetes (Dematiaceae)	0	0	+++	+	0	+
Basidiomycetes (Ustilaginales)	0	0	+	+	+	+++

аналогично образованию щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной. В этой реакции также участвуют биотин и используется энергия фосфорных связей, получаемая от АТФ. Во всех реакциях биосинтеза жирных кислот ведущую роль занимает КоА (рис. 3.8).

Первый этап биосинтеза насыщенных жирных кислот состоит во включении CO_2 в ацетил-КоА, в результате чего образуется малонил-КоА.

Во втором этапе происходит конденсация малонил-КоА с новой порцией ацетил-КоА, в результате чего синтезируется содержащий пять атомов углерода ацетомалонил-КоА.

Вслед за этим протекает третий этап — восстановление и декарбоксилирование ацетомалонил-КоА с образованием бутирил-КоА, содержащего уже четыре атома углерода. В этой реакции принимает участие НАДФ·Н.

Конденсация с малонилкоэнзимом А может повторяться большее число раз, каждый раз сопровождаемая декарбоксилированием и восстановлением, что приводит к добавлению на каждой ступени по два атома углерода к образующейся цепи жирной кислоты. Принимающие в этом процессе участие ферменты и кофакторы приведены в схеме на рис. 3.8, 3.9.

Образование насыщенных жирных кислот обычно происходит на фоне более восстановленного режима обмена, т. е. при относительно низком рН системы, тогда как насыщенные жирные кислоты требуют для биосинтеза большего преобладания процессов окисления, т. е. более высокого уровня рН и участия в биосинтезе окисленной формы НАД⁺. При этом ацилированная форма насыщенной жирной кислоты ($\text{R}-\text{CO}-\text{SКоА}$) отдает по второму и третьему атомам углерода два атома водорода и по этим атомам углерода образуется двойная связь. По ней может присоединяться с помощью энолгидразы молекула воды, образуя оксикислоту, которая при вторичном окислении НАД⁺-дегидрогеназой дает кетокислоту, способную отщеплять по кетогруппе фрагмент ацетил-КоА. Образующиеся в результате такого окисления и расщепления жир-

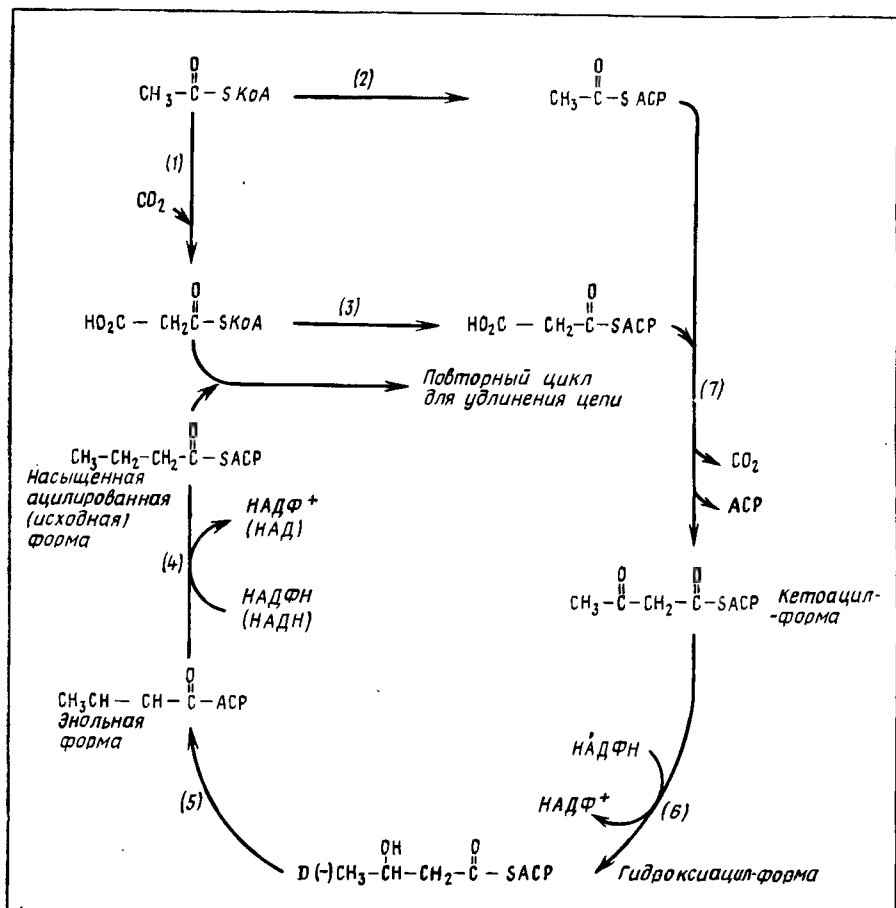
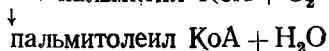
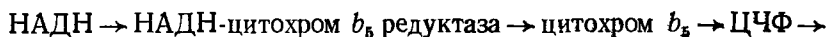


Рис. 3.9. Путь биосинтеза жирных кислот (Weete, 1980). SCoA — коэнзим А; SACP — переносящий ацильные группы протеин. Участвующие в синтезе жирных кислот ферменты: 1 — ацетил-КоА-карбоксилаза; 2 — ацетил-КоА-АСР-трансацилаза; 3 — малонил-КоА-трансацилаза; 4 — эноил-АСР-редуктаза; 5 — 3-гидрокси-АСР-дегидраза; 6 — 3-кетоацил-АСР-редуктаза; 7 — кетоацил-АСР-синтетаза

риях с участием карнитина в переносе через мембрану (рис. 3.10) ацилированных жирных кислот. Это хорошо согласуется с отмеченным ранее (Беккер, 1956, 1963) совпадением снижения количества жиров в мицелии продуцента пенициллина и других грибов с дифференцировкой клеточных структур, в частности с сильным обогащением митохондриями. Напротив, более ранний в их онтогенезе период накопления жиров характерен, судя по цитохимическим признакам, обилием в гифах микросомальной фракции.

Приведенное выше представление о ходе биосинтеза жирных кислот требует некоторых дополнений: во-первых, порядок очеред-

ности формирования жирных кислот в настоящее время трактуется как последовательность от кетоформы, через гидроксиформу и энольную, к насыщенному состоянию, а не наоборот (см. рис. 3.8). Обратный порядок приписывается не синтезу, а использованию жирных кислот. Во-вторых, у грибов обнаружен путь формирования ненасыщенных жирных кислот из насыщенных, который локализован в микросомальной фракции цитоплазмы и включает оксигеназную систему с участием цитохрома 450, весьма сходную с таковой у дрожжей (Weete, 1980). Порядок реакций в этой системе следующий:



(ЦЧФ — цианидчувствительный фактор)

Данные о сравнительных свойствах синтетаз жирных кислот у разных организмов (Weete, 1980) показали, что у грибов они ближе к синтетазам млекопитающих. Синтетазы как у животных, так и у грибов представляют собой не индивидуальные ферменты (как у бактерий и растений), а мультиферментные системы.

Распад жиров в клетках грибов происходит в более поздних стадиях онтогенеза либо при формировании из ненасыщенных жирных кислот низкомолекулярных насыщенных фрагментов (Беккер, 1956, 1963), либо при полном их окислении с последовательным отщеплением двухуглеродных фрагментов ацетата, деградирующих в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 и воды. Распад этого типа (β -окисление) энергетически очень продуктивен, так как окисление каждого двухуглеродного фрагмента дает формирование пяти молекул АТФ, для начальной же активации этого процесса требуется только одна молекула АТФ.

Уравнение реакции трансформации жирной кислоты: Жирная кислота $\text{C}_{18} + 1 \text{ АТФ} + 8 \text{ КоАШ} + 7 \text{ ФАД} + 7 \text{ НАД}^+ \rightarrow 8 \text{ АцКоА} + 7 \text{ ФАДН}_2 + 7 \text{ НАДН} + 7 \text{ Н}^+ + \text{АМФ} + \text{РР}_n$ (пирофосфат). Исходя из этого рассчитано, что при распаде одной молекулы пальмитиновой кислоты (жирная кислота C_{18}) с последующим полным окислением восьми молекул ацетил-КоА в цикле ТКК получается выход 130 молекул АТФ на одну молекулу жирной кислоты, которые состояются из 21 моля АТФ в результате окисления восьми молей НАДН ($3 \times 7 \text{ НАДН}$), 14 молей АТФ при окислении ФАДН₂ ($2 \times 7 \text{ ФАДН}_2$), а также из 95 молекул АТФ от окисления восьми молекул АцКоА ($12 \times 8 \text{ АцКоА}$) — 1 АТФ на активацию. Выход энергии в калориях на 1 моль кислоты C_{18} равен 2330 ккал/моль, что дает КПД порядка 42% (Weete, 1980).

Сходным образом с жирными кислотами синтезируются, а подчас используются в обмене полиены с большим количеством двойных связей, которые часто являются антибиотиками почвенных грибов или входят в их состав; например, кротоновая и декатетра-

эновая кислоты, входящие в состав антибиотиков трихотецина и фумагиллина, а также антибиотики палитантин и фреквентин.

Обычно особенно богаты жирами приспособления грибов, предназначенные для сохранения вида в экстремальных условиях температуры или при недостатке воды, как склероции или хламидоспоры. Это объясняется, с одной стороны, защитной ролью жиров в повышении стойкости к изменениям температуры и к потере влаги, а с другой — их функцией как энергетического и строительного резерва для биосинтезов при прорастании.

В связи с их важной функцией в составе клеточных мембранных структур липиды, в особенности их фосфолипидная фракция, в частности и у грибов, стали изучаться особенно детально. Исследован жирно-кислотный состав мицелия и плодовых тел около 200 видов грибов, данные о которых приведены в сокращенном виде в табл. 3.3.

Из результатов исследований, в табл. 3.3, можно извлечь в основном только довольно тривиальный вывод о преобладании у грибов вообще пальмитиновой и олеиновой кислот, а начиная с муко-

Таблица 3.3

Распространение жирных кислот в составе липидов грибов из различных таксономических групп (Weefe, 1980) (+++) — 20—30% от суммы жирных кислот; (++) — 10—20%; (+) — 1—10%; (±) — данные расходятся у разных видов; (—) — отсутствует

Таксономическая группа	Изучено видов	Встречаемость жирных кислот							
		C ₁₄	C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{20:4}
Oomycetes	3	++	+++	+	+	+++	++	+	++
Trichomycetes	1	+	+++	+++	+	++	—	—	—
Hypochytridiales	2	±	+++	++	±	++	+	±	—
Chytridiales	1	следы	++	—	+	+++	+	+	—
Blastocladales	2	+	++	+	+	+++	++	±	±
Zygomycetes (Entomophthorales)	7	++	++	+	+	++	+	+	++
Zygomycetes (Mucorales)	5	+	++	+	++	+++	+++	++	—
Ascomycetes (Sacharomycetales)	60	±	++	++	+	+++	+++	+	—
Ascomycetes (гифообразующие) + Deuteromycetes	42	±	++	+	+	++	+++	+	±
Heterobasidiomycetes	3	+	++	+	+	++	+++	+	—
Homobasidiomycetes	55	+	++	+	+	++	+++	+	±

ровых грибов и выше в порядке их эволюции дополнительно линолевой и в меньшей мере линоленовой. Из кислот более высокомолекулярных приуроченностью к определенным группам грибов обладает кислота C_{20:4} (арахидоновая), присущая, видимо, оомицетам и с большей степенью достоверности энтомофторовым гри-

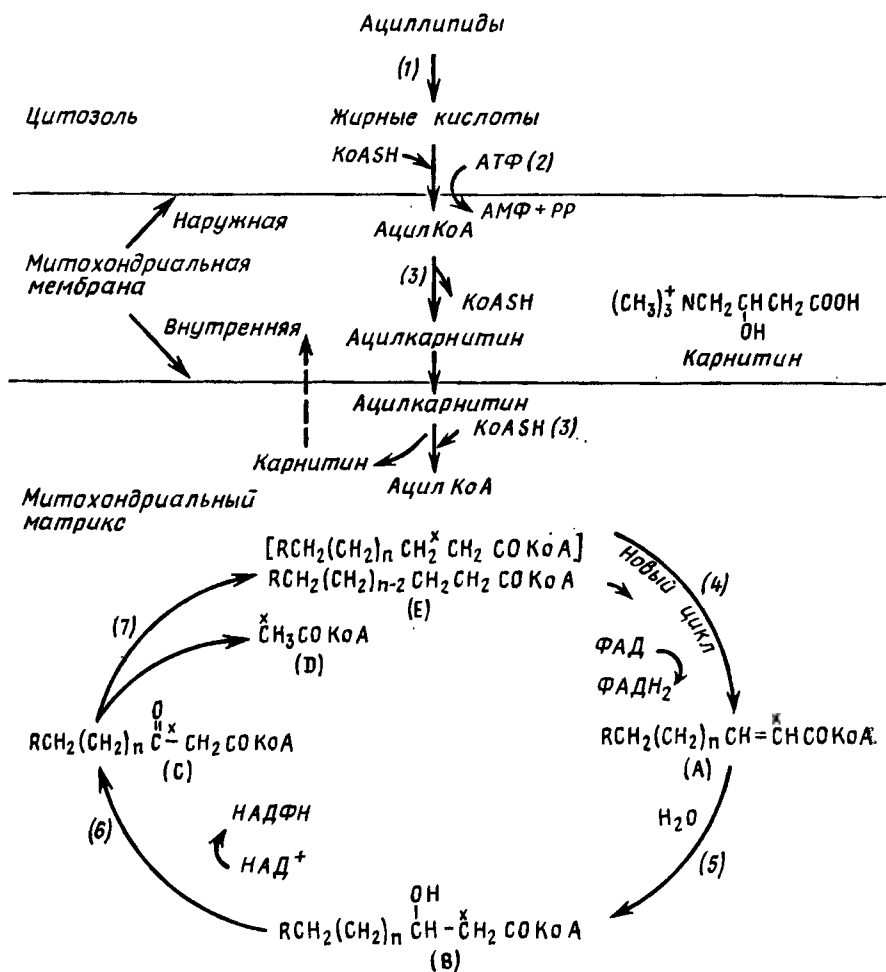


Рис. 3.10. Транспорт ацильных единиц через митохондриальную мембрану и β -окисление жирных кислот (по Weete, 1980). Промежуточные продукты: (А) — транс- Δ^2 -ацил-КоА; (В) — L(+)- β -гидроксиацил-КоА; (С) — β -кетоацил-КоА; (D) — ацетил-КоА; (Е) — ацил-КоА. Участвующие в транспорте энзимы: 1 — липаза; 2 — ацилтнокиназа; 3 — ацил-КоА-карнитинтрансацилаза; 4 — ацил-дегидрогеназа; 5 — эноилгидратаза; 6 — 3-гидроксиацилдегидрогеназа; 7 — 3-кетоацилтиолаза

бам класса зигомицетов (см. табл. 3.3), что может говорить о более позднем происхождении и экологической значимости жирных кислот высоких порядков молярности и ненасыщенности у грибов.

В связи с потребностью медицинской промышленности в простагландинах жирные кислоты с высоким числом атомов углерода, продуцируемые некоторыми грибами, привлекли особое внимание как возможное сырье для изготовления этих препаратов. Пред-

шественником простагландинов, осуществляющих регуляцию хода воспалительных и аллергических процессов и стимулирующих активность фермента, синтезирующего циклический АМФ, аденилат-

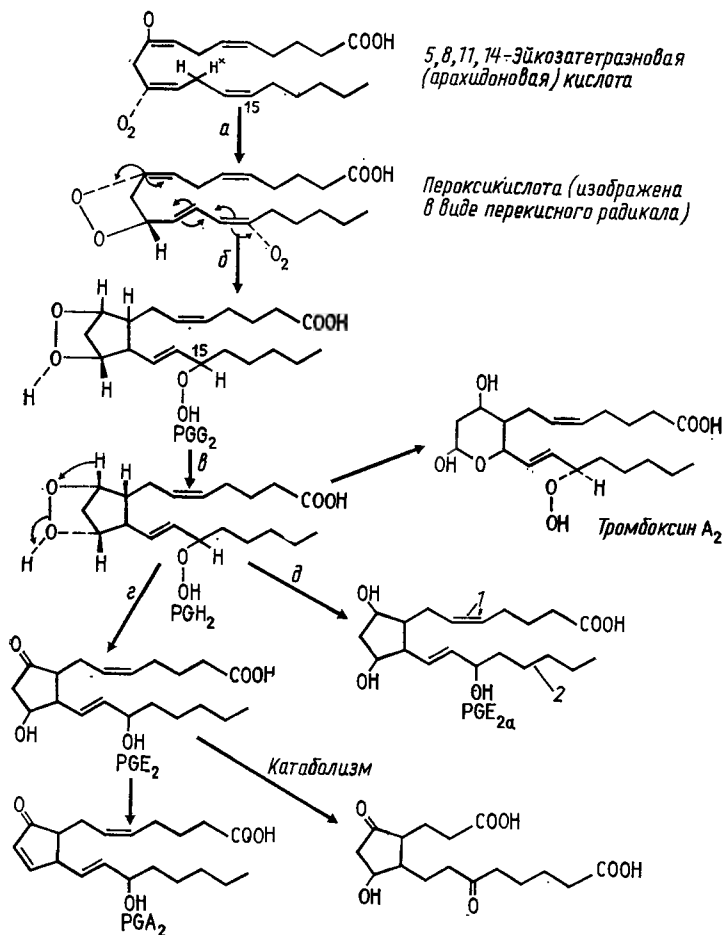


Рис. 3.11. Биосинтез простагландинов и некоторые реакции их распада: *a* — реакция сходная с действием липооксигеназы, в ходе которой происходит отщепление протона (H^+) у C—13; *б* — формирование простагладина G_2 ; *в*, *г*, *д* — формирование соответственно простагландинов H_2 , E_2 и E_{2a} ; *д* — восстановительное расщепление перекиси. Стрелки при PGE_{2a} : 1 — в простагладинах ряда 1 эта двойная связь отсутствует; 2 — в простагладинах ряда 3 присутствует еще одна двойная связь (Мецлер, 1980)

циклазу, которые имеют очень различную направленность действия в зависимости от типа, является 5,8,11,14-эйкозотетразная, или арахидоновая кислота (рис. 3.11). В связи с проблемой ее биосинтеза у ряда грибов состав липидов изучался в последние годы

более подробно. В научной литературе опубликовано много материалов на эту тему. В частности, изучались грибы из класса зигомикетов (мукоровые и энтомофторовые) и некоторые несовершенные грибы со своеобразной экологией нематофагов или микопаразитов.

У хорошо освоенного в промышленных условиях продуцента каротиноидов *Blakeslea (Choanephora) trispora* липиды представлены в основном триглицеридами и несколько в меньшей степени суммарной фракцией фосфолипидов и моноглицеридов, дополняемых позднее формирующимися стеролами и свободными жирными кислотами (Дедюхина, Бехтерева, 1968). Состав их характеризуется обилием пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот, с некоторым преобладанием насыщенных кислот над ненасыщенными. В культуре на глюкозе количество последних со временем увеличивается, чего не происходит в культуре с добавкой *n*-гексана (Бехтерева и др., 1969). Среди жирных кислот, находящихся в составе фосфолипидов *B. trispora*, есть различия между культурами разного пола (+ и — штаммами). Например, олеиновой кислоты больше у штамма (+), тогда как линолевой у штамма (—), хотя степень насыщения суммы жирных кислот у обоих штаммов примерно равна, а в смеси их в 3 раза выше. Качественный их состав близок к общим липидам, но несколько уже и не включает представителей с наиболее короткой (C₁₂) и наиболее длинной (C₂₀) цепью.

Образование липидов у *B. trispora* оказывается до некоторой степени коррелирующим с синтезом каротиноидов (табл. 3.4), что,

Таблица 3.4

Биомасса, липиды и каротиноиды в мицелии *Blakeslea trispora* при росте на среде с различной концентрацией глюкозы (Дедюхина, Бехтерева, 1969)

	1% глюкозы		10% глюкозы	
	3 сут.	6 сут.	3 сут.	6 сут.
Биомасса, г/100 мл	0,32	0,28	0,61	0,68
Липиды, %	12,5	6,6	32,4	41,3
Триглицериды в липидах, %	44,7	12,3	59,7	66,9
Каротиноиды, мкг/г	221	214	2434	2117
Остаточная глюкоза, %	0	0	6,8	6,6
pH (конечный)	6,6	6,9	5,4	4,2

возможно, связано с их общим происхождением из ацетил-КоА (рис. 3.10 и 3.12), хотя возрастание последних в зависимости от содержания сахара в среде намного превосходит возрастание концентрации общих липидов и триглицеридов (Дедюхина, Бехтерева, 1969).

Исследование жирно-кислотного состава фосфолипидов двух видов мукоровых грибов из того же, что и *Blakeslea* семейства

Choanephoraceae, а именно *Cunninghamella elegans* и *C. homotallica*, показало сходные с фосфолипидами *Blakeslea trispora* результаты. В обоих случаях ведущими в составе фосфолипидов оказа-

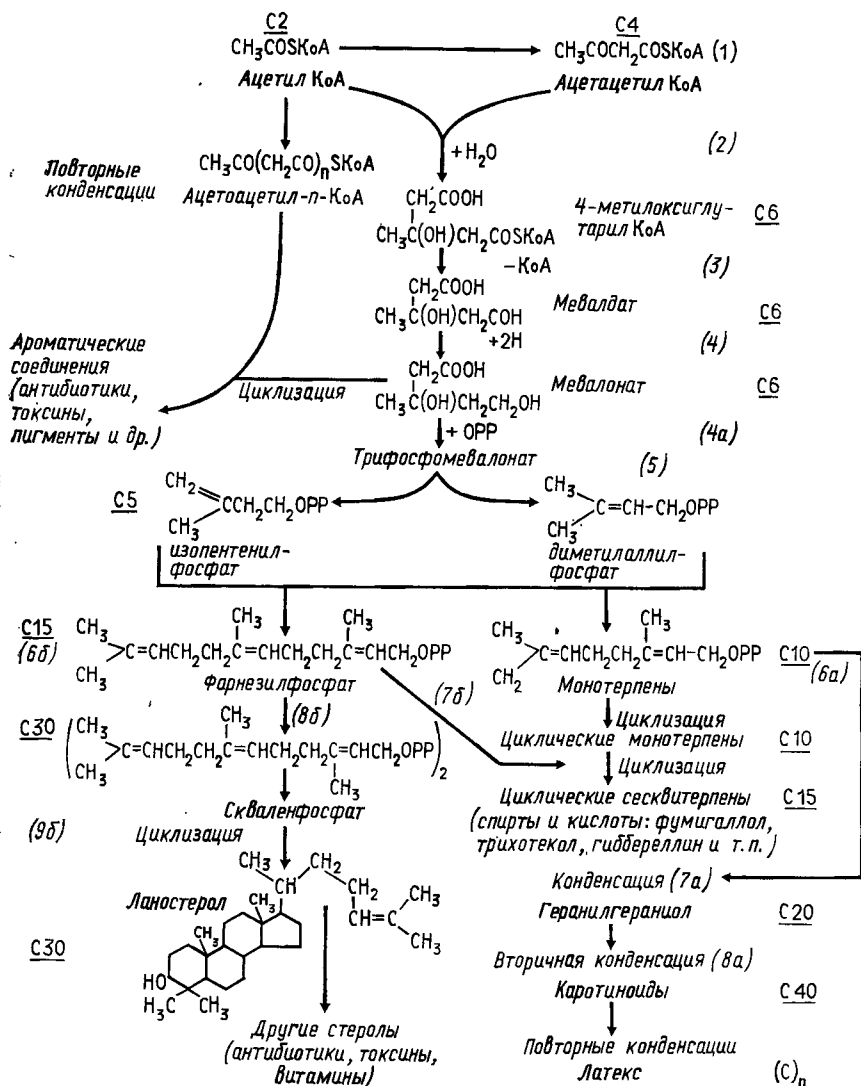


Рис. 3.12. Схема обмена терпенов (Miller, 1961), модифицированная и дополненная применительно к грибам

лись пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты, в стабильно близкой концентрации включались пальмитолеиновая и стеариновая. Коэффициент насыщения, показывающий преобладание при-

мерно в три раза ненасыщенных форм, был почти идентичен у всех трех видов. Единственными отличиями видов рода *Cunninghamella* оказались стабильное присутствие у них от 7 до 12% линоленовой кислоты и расширение качественного состава жирных кислот, в особенности в сторону высокомолекулярных, вплоть до содержащих 24 атома углерода в цепи (Бехтерева, Яковлева, 1980).

Своей специфичностью сильно отличается от жирно-кислотного состава муковых грибов аналогичный состав общих липидов видов рода *Entomophthora*, растущих на синтетической среде с бактопептоном и дрожжевым экстрактом, что исключает заимствование состава от насекомых, на которых они обитают в природе (Попова и др., 1980).

Он оказался очень разнообразным, включая для вида *Entomophthora thaxteri* 26 жирных кислот с размером цепи от 9-углеродной до 24-углеродной, против 13, установленных у *Blakeslea tri-spora*. Он характерен обилием низкомолекулярных кислот типа лауриновой и миристиновой, в ущерб пальмитиновой и стеариновой, и обилием высокомолекулярных (C_{18} — C_{20}) ненасыщенных жирных кислот с различно расположенными двойными связями, что, в общем, снижает степень насыщенности их суммы.

Кроме всего этого особенно обращает на себя внимание наличие у них разветвленных (изоформ) жирных кислот и обилие входящей до 10% состава у *E. thaxteri* высоконенасыщенной ($C_{20:4}$) арахидоновой кислоты, что характерно для липидов некоторых животных, в частности для червей — гельминтов (Соргун, 1978).

В процессе развития культур *Entomophthora* количество (в зависимости от вида) различных жирных кислот имеет таксономическое значение, хотя наиболее высокомолекулярные (C_{18} , $C_{20:4}$) сохраняются в течение вегетации на мало изменяющемся уровне (Попова и др., 1980). Жирно-кислотный состав фосфолипидов двух видов *Entomophthora* сходен с составом их в общих липидах этого рода и в нем также обильны миристиновая и пальмитиновая кислоты, хотя качественный состав компонентов уже (23 жирных кислоты вместо 29 в общих липидах). Присутствуют также разветвленные изоформы жирных кислот, а количество арахидоновой кислоты ($C_{20:4}$), возможно важной для снижения ригидности клеточных мембран хозяев этих паразитных грибов, доходит к концу роста до 13—18% общего состава. Судя по уровню коэффициента насыщения ненасыщенность фосфолипидов у этого рода еще более выражена, чем в случае жирно-кислотных компонентов общих липидов. Состав жирных кислот фосфолипидов у исследованных видов сходен, за исключением большого преобладания у *E. conica* пальмитолеиновой кислоты (20—23% $C_{16:1}$).

Из числа дейтеромицетов исследовался состав общих липидов четырех видов (в числе пяти штаммов) хищных грибов из рода *Arthrobotrys*, специализированных на залавливании нематод (Раджабова и др., 1980). Фракционный состав этих липидов довольно закономерно отличается в зависимости от используемой для их выращивания среды, причем, хотя на среде Мейзе с глюкозой ко-

личество их оказывается большим, чем на среде Стефанини с сахарозой, количество фосфолипидов при росте на последней возрастает в 2—3 раза. У всех видов *Arthrobotrys* на обеих средах в составе липидов обильно представлены триглицериды (от 25 до 80%) и стеролы (до 12%). Последние являются компонентами биогенеза терпенов, продукты которого, видимо, участвуют в форме латексов и токсинов в актах хищничества грибов этого рода (Беккер, 1972). Жирно-кислотный состав общих липидов, в котором преобладают пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты, относительно узок, что, как и в случае *Blakeslea trispora*, можно объяснить конкуренцией этого пула с шунтом терпенов (*Arthrobotrys*, как и *Blakeslea*, синтезирует каротиноиды и, кроме того, много других веществ, формирующихся по этому пути).

Также относительно узок жирно-кислотный состав общих липидов у продуцента сесквитерпенового антибиотика трихотецина, формирующегося также в шунте терпенов, микопаразита *Trichothecium roseum*. Однако его отличает обилие накапливающихся одновременно с антибиотиком на третий-четвертый дни культивирования высокомолекулярных сильноненасыщенных жирных кислот, в частности арахидоновой, количество которой не уступает обнаруживаемому у *Entomophthora* (Зеленева и др., 1979).

При сравнении жирно-кислотного состава фосфолипидов актиномицетов и грибов (Ковальчук и др., 1980) обнаруживается сходство по содержанию пальмитиновой, пальмитолеиновой и олеиновой кислот. Отличие состоит в меньшем диапазоне вариаций в числе атомов углерода в цепи у актиномицетов, в большей насыщенности жирных кислот и обилии их с нечетным числом атомов углерода в цепи.

По проценту жирных кислот с нечетным числом атомов углерода в цепи особенно сильно отличаются от актиномицетов сапрофитные мукоровые грибы родов *Blakeslea* и *Cunninghamella*, в фосфолипидах которых они полностью отсутствуют, что указывает на преобладание у них обычного пути синтеза и деградации жирных кислот с участием ацил-КоА. Напротив, наличие жирных кислот с нечетным числом атомов углерода указывает на изменения путей их биосинтеза со включением малоната без дальнейшего декарбоксилирования (см. рис. 3.8). Сближение в этом отношении с актиномицетами возможно для паразита насекомых *Entomophthora* и хищного гриба *Arthrobotrys*, но насыщенность жирных кислот, обеспечивающая им более свободное функционирование мембранно-связанных ферментов, у грибов выше. Необходимо отметить, что наиболее высокомолекулярные и сильноненасыщенные жирные кислоты (например, арахидоновая) встречались исключительно у мико- или энтомопаразитов (*Trichothecium* и *Entomophthora*), а также у некоторых паразитов растений из числа оомицетов, как *Pythium* и *Phytophthora* (см. Weete, 1980).

Как уже упоминалось выше, особенно важную структурную роль липиды, в том числе и жирные кислоты, играют в строении клеточных мембран, как ограничивающих клетку в целом, так и

ее вакуоли и митохондрии. Данных в этом направлении, касающихся грибов, пока немного и они ограничиваются примерами из числа дрожжей. Жирно-кислотный состав плазмалеммы и митохондриальных мембран близок и, как и в общих липидах, характерен преобладанием пальмитиновой, олеиновой, а также пальмитолеиновой кислот.

Однако главным определяющим свойства различных мембран компонентом являются не столько жирные кислоты, сколько их сочетания с другими компонентами фосфолипидов, в частности с холином в фосфатидилхолине (PC), с этаноламином в фосфатидилэтаноламине (PE), с инозитом в фосфатидилинозите (PI), с серином в фосфатидилсерине (PS) и с дифосфатдиглицерином в кардиолипине (CL). Все эти формы фосфолипидов встречаются у грибов, и сочетания их в структуре плазмалеммы и тонопласта отличаются много сильнее, чем жирно-кислотный состав (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Состав плазмалеммы и тонопласта *Saccharomyces cerevisiae* (по Weete, 1980)

Компоненты	Плазмалемма	Тонопласт
Протеин/общие липиды (ОЛ)	2,1	0,66
Фосфолипиды (% от ОЛ)	6,4	40,0
Нейтральные липиды (% от ОЛ)	93,5	60,0
Эргостерин (% от нейтральных липидов)	26,2	6,05
Стеро́лы/ фосфолипиды		
масса	4,65	0,16
молярность	8,97	2,9
Фосфатидилхолин*	34	33
Лизофосфатидилхолин	0	5
Фосфатидилэтаноламин	20	15
Фосфатидилинозит	28	43
Фосфатидная кислота	15	0
Другие фосфолипиды	3	4

* Фосфолипиды выражены как процент липидного фосфата.

Прежде всего липидов в тонопласте примерно в 2 раза больше, чем протеина, тогда как в плазмалемме отношение обратное. Основной фон в липидах мембран составляют не фосфолипиды, а стеролы, превышающие по молярности фосфолипиды, особенно в плазмалемме в 3—9 раз. Главным из них, особенно в плазматической мембране, является эргостерин. По составу отдельных фосфолипидов в клеточной мембране и тонопласте тоже имеются различия, вероятно, имеющие отношение к различиям в их функциях. Например, в плазмалемме отсутствует лизофосфатидилхолин, тогда как только в ней обнаруживается фосфатидная кислота.

При общем анализе фосфолипидных компонентов у грибов из различных таксономических групп выявляется общее правило обилия во всех их группах PC и PE. В группах сумчатых и высших

базидиальных грибов учащаются встречи реже наблюдаемых у низших грибов PS и PI, тогда как у дрожжей почти в равной мере с ними представлен и CL. Отмечается также не только качественное, но и количественное сходство в наборе фосфолипидов, например у всех близких к роду *Saccharomyces* дрожжей, у представителей родов *Fusarium* и *Cephalosporium*.

Состав фосфолипидов разного типа в плазмалемме, митохондриях, микросомах и тонопласте дрожжей и в респираторных частицах спорыньи, приведенный в табл. 3.6, показывает наиболее:

Таблица 3.6

Состав глицерофосфолипидов субклеточных фракций *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergiensis* и *Claviceps purpurea* (Weete, 1980)

Вид и фракция	Фосфолипиды, %						
	PC	PE	PI	CL	PA	PS	PG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
Клеточный гомогенат	29	14	13	7	2	5	3
Мембрана протопласта	26	40	26	—	5	—	—
Вся оболочка	45	15	30	5	5	—	—
Плазмалемма	34	20	28	—	15	—	—
Митохондрии	38	29	9	13	0,3	2	0,7
Промитохондрии	41	18	19	7	—	7	—
Тонопласт	33	15	43	—	—	—	—
Микросомы	41	12	28	2	1	7	—
<i>S. carlsbergiensis</i>							
Митохондрии (+инозит)							
внутренние	24	28	10	9	—	8	—
внешние мембраны	44	16	11	6	—	3	—
Митохондрии (—инозит)							
внутренние	22	15	4	13	—	—	—
внешние мембраны	78	9	3	1	—	—	—
<i>Claviceps purpurea</i>							
Респираторные частицы (митохондрии?)	27	18	28	—	—	13	—

Примечание. PA — фосфатидная кислота, PG — фосфатидилглицерин, PC — фосфатидилхолин, PE — фосфатидилэтаноламин, PL — фосфатидилинозит, CL — кардиолипин, PS — фосфатидилсерин.

широкое разнообразие этих компонентов в митохондриях и наиболее узкое в составе PC, PE и PI в тонопласте. Постоянно преобладают во всех фракциях мембран PC, PE и PI. Структурная роль стеролов, в особенности эргостерина, пути биосинтеза которого излагаются ниже, несомненно очень велика для мембранных образований, так же, как и роль мембранных белков, которая, к сожалению, еще недостаточно изучена.

Шунт терпенов у грибов особенно часто несет функции обмена с экологическим назначением, так как в нем синтезируется особенно большое количество соединений типа антибиотиков, токсинов, пигментов и других веществ с конкурентной, агрессивной (у паразитов) и защитной функцией. Этот путь биосинтеза начинается с ацетилкоэнзима А как и биосинтез жиров (см. рис. 3.12/Miller, 1961), в частности с образования, при конденсации двух молекул ацетил-КоА, ацетоацетилкоэнзима А, т. е. четырехуглеродного продукта из двух, содержащих по два атома углерода. Во втором этапе этого пути биосинтеза происходит повторная конденсация ацетоацетил-КоА с ацетил-КоА с образованием шестиуглеродного соединения, метилоксиглутарил-КоА. Утрачивая в дальнейшем связь с коэнзимом А, это соединение трансформируется в мевалдовую кислоту, содержащую кроме карбоксила еще и альдегидную группу.

В четвертом этапе биосинтеза терпенов это соединение восстанавливается с образованием мевалониевой кислоты, у которой альдегидная группа мевалдата заменена спиртовой. Одновременное наличие у мевалоната спиртовой гидроксильной и карбоксильной групп наделяет это соединение способностью к дальнейшим процессам циклизации и конденсации. В результате этого оно часто является исходным пунктом для дальнейших биосинтезов многих циклических соединений типа антибиотиков, пигментов и других, которые образуются при конденсации его с содержащими различное число атомов углерода фрагментами ацил-А.

Однако основной путь биосинтеза обычно приводит к фосфорилированию мевалоната, который в следующем, пятом, этапе этого метаболизма декарбоксилируется, трансформируясь в изопентенилфосфат или диметилаллилфосфат, содержащие по пять атомов углерода каждый и имеющие структуру, характерную для изопренов. В дальнейшем биосинтез может идти по двум альтернативным путям, но постоянно при участии фосфорилирования. Один из путей состоит в конденсации этих двух соединений в десятиуглеродную цепь алифатического или циклического строения. Соединения этого типа после их дефосфорилирования оказываются летучими и обладают сильно выраженным ароматическим запахом, входя в состав эфирных масел высших растений. Такие ароматические соединения, видимо, встречаются также и у многих грибов, например у хищных грибов из рода *Arthrobotrys* (Беккер, 1972).

Такие соединения с десятиуглеродным строением носят название монотерпенов и могут конденсироваться далее с образованием дитерпенов, содержащих двадцать атомов углерода (или четыре изопреновых фрагмента). Примером дитерпенов может служить геранилгераниол, который считается основным предшественником каротиноидных пигментов, широко представленных у грибов (Гудвин, 1954). Образование геранилгераниола и каротиноидов, види-

мо, также происходит за счет использования энергии фосфорных связей, дающих возможность конденсации до сорока атомов углерода каротиноидов, концевые группы которых могут далее циклизоваться с образованием α - и β -иононовых групп. Описан способ их формирования (Weete, 1980).

У целого ряда грибов, например у рода *Lactarius* из базидиомицетов и у хищных грибов нематофагов (Беккер, 1972), могут образовываться также латексоподобные вязкие и клейкие вещества, концентрирующиеся либо в клетках плодовых тел (у *Lactarius*), либо на поверхности ловчих колец мицелля (у хищного гриба *Arthrobotrys* и подобных ему видов).

По-видимому, такие вещества представляют собой изотерпеновые высокомолекулярные соединения, сходные по составу и биогенезу с латексом высших растений и образующиеся из моно- и димеров терпенов по этому же пути метаболизма. Как и латексы каучуконосов, они застывают на воздухе, превращаясь в вязкие и упругие резиноподобные вещества при их окислении. Их экологическое назначение еще не всегда понятно, однако в случае хищных грибов, залавливающих нематод, они несомненно принимают участие в акте хищничества.

Второй альтернативный путь биогенеза терпеновых соединений состоит в конденсации одной молекулы диметилаллилфосфата с двумя молекулами изопентенилфосфата с образованием пятнадцатуглеродного соединения — фарнезилфосфата, дающего начало большому классу циклических терпенов, носящих название сесквитерпенов. Этот синтез так же, как и последующая конденсация

двух молекул фарнезилфосфата в соединение с тридцатью атомами углерода — фосфорилированный сквален, происходит, как и ранее, при использовании энергии фосфорных связей. Дальнейшая циклизация сквалена приводит к образованию ланостерола, из которого образуются очень обильные и разнообразные у грибов циклические соединения из класса стероидов.

Следует отметить, что именно путь биосинтеза стеролов является одним из наиболее ярких биохимических признаков, отличающих грибы от растений и бактерий приближающих их обмен к животным. Это отличие наблюдается уже на первом этапе синтеза стеролов в момент циклизации

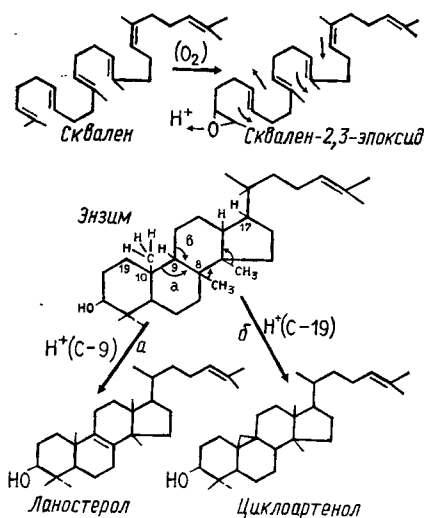
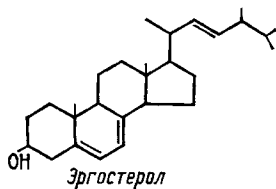


Рис. 3.13. Циклизация 2,3-сквалена с образованием ланостерола (у животных и грибов) или циклоартенола (у растений/Weete, 1980)

скавалена (рис. 3.13), когда из скавалена 2,3-эпоксида в случае грибов и млекопитающих формируется ланостерол, а в организмах растений и у микроорганизмов — циклоартенол.

Принципиальные различия в ходе биосинтеза стеролов, в их групповом составе и происхождении у растений, животных и грибов заключаются в следующем.

Главным стеролом большинства грибов является принадлежащий к группе 4-десметил- C_{28} -стеролов эргостерол, биосинтез которого идет через ланостерол, зимостерол, фекостерол и эргоста-8,24-диэнол:



Эргостерол, являющийся у большинства грибов наиболее обильным и постоянным стеролом, сопровождаясь большей частью некоторыми другими стеролами из той же группы 4-десметил- C_{28} -стеролов, отсутствует только у оомицетов из порядка *Saprolegniales* и у ржавчинных грибов (табл. 3.7). Возможно, что последние заимствуют характерные для них стеролы из группы стигмастерола у растений, на которых они произрастают. Однако такое предположение по поводу сапролегниевых грибов исключается. Здесь можно только, как и в случае их клеточной оболочки, почти целиком состоящей из целлюлозы, отнести факт отсутствия у них эргостерола к их иному происхождению, чем у грибов, синтезирующих хитин и эргостерин и тяготеющих к свойствам обмена, характерным для животных. В противоположность к ним оомицеты в части синтеза как полисахаридов, так и стеролов явно тяготеют к метаболизму, характерному для растений.

Обе альтернативно формирующиеся в шунте терпенов группы циклических соединений — циклические спирты, образующиеся из фарнезола, и стеролы, производные скавалена и ланостерола, играют у многих грибов важнейшие экологические роли и обладают очень ярко выраженными различными видами биологической активности. Сесквитерпеновые спирты входят в состав противогрибных антибиотиков и токсинов, известных под общим названием трихотецинов (трихотецина, роридина, триходермина, веррукарин/Кожибски и др., 1969; Беккер, 1972), а также антифаговых, протистоцидных (фумагиллин) и нематоцидных веществ (Беккер, Раджабова, 1972). Их содержат специфические индукторы роста и развития высших растений гормонального типа, продуцируемые грибами, например гиббереллин.

Из числа стеролов помимо обильно продуцируемого грибами провитамина D — эргостерина, само название которому дали рожки спорыньи, грибы образуют антибиотики типа полипореновой

Распространение преобладающих стеролов в различных таксономических группах грибов (Weete, 1980):
 обозначения: (++++) — 100%; (+++) — ≥ 50%; (++) — 30—50% видов

Таксономическая группа	Число испытанных видов	4,4, 14-триметил		4-десметил C ₂₇ (группа холестерина)		4-десметил C ₂₈ (группа эргостерола)					4-десметил C ₂₉ (группа стигмастерола)			
		лано-стерол	холестерол	десметил-стерол	фунги-стерол	дегидро-стерол	метилен-стерол	эрго-стерол	Δ ⁵ стигма-стерол	стигмаста-7-24-дие-нол	фуко-стерол			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Сапролегниевые	9		++	++			++					++		
Хитридиевые	1		++				++	++				++		
Мукоровые	12		+			++		++				++		
Дрожжи	4	++			++			++				++		
Пирениомикеты	3					++		++				++		
Дискомицеты	1			++		++		++				++		
Плектасковые	9					+		++				++		
Дейтеромицеты	2							++				++		
темноокрашенные	3	+	+		++	+		++	++		++			
Головневые	6				++	++		++	++					
Ржавчинные	6				++	++		++	++					
Афиллофоровые	1				++	++		++	++					
Агариковые								+						

кислоты у базидиомицетов, гельволевой кислоты у *Aspergillus fumigatus*, фуцидина у *Acremonium fusidioides*, розололактона у *Trichothecium roseum* и токсины, подобные токсинам *Fusarium* из секции *Sporotrichiella* (Олифсон, 1957).

Весь обмен терпеновых соединений обычно протекает на фоне низкого гН и поддерживается в условиях восстановления, в результате чего в процессе его лишь изредка образуются кислоты, а главным образом спирты и даже углеводороды, например летучие терпены, каротиноиды и латексы. Эта особенность приводит еще к одной важной экологической роли этих соединений. Они, например каротиноиды, нередко несут в обмене грибов функции антиоксидантов, предохраняющих их от избыточного окисления.

Подобную же роль противолучевых экранов и антиоксидантов играют, видимо, и синтезирующиеся по пути, сходному с синтезом стероидов или ароматических аминокислот, меланины (Allport, Bu'Lock, 1960; Жданова, 1976), распространенные у темноокрашенных сумчатых грибов и гифомицетов, у которых их ритм спорообразования регулируется светочувствительными факторами, например рибофлавином. Такой случай наблюдается у гифомицета *Alternaria* (Luckens, 1963).

Очень многие биологически активные вещества грибов относятся к ароматическим соединениям, производным бензола, нафтола и т. п. Относительно путей их образования существовал ряд гипотез, которые в последнее время свелись в основном к двум: 1) образование через шикимовую кислоту, изученное на бактериях и биохимических мутантах *Neurospora crassa*, и 2) через конденсацию производных и аналогов мевалониевой кислоты между собой или с ней самой, структура которой весьма пригодна для циклизации. Последний тип синтеза многократно изучался методом меченых атомов на очень многих видах грибов.

Биосинтез производных бензола (или фенола) через шикимовую кислоту идет следующим образом (рис. 3.14/Miller, 1961). Происходит циклизация продуктов пентозного шунта обмена, вероятно исходя из стадии седогептулозы, которая приводит к образованию 5-дегидрошикимовой кислоты. 5-дегидрошикимовая кислота способна как прямо трансформироваться, при ее восстановлении и отщеплении молекулы воды, в 3,4-дигидроксибензойную кислоту, так и восстанавливаться до шикимовой кислоты. В свою очередь шикимовая кислота может превращаться, при ее восстановлении и аминировании, в антралиловую. В этом же пути метаболизма образуется фенилпировиноградная кислота.

Второй путь биосинтеза производных фенольного ряда возможен через конденсацию соединений терпенового типа, сходных с мевалониевой кислотой, или с мономерами изопренового строения (Vaněk, Sucěk, 1962).

Образование ароматических соединений у грибов имеет значение не только в связи с биосинтезом антибиотиков и ряда пигментов, но также связано с их ролью в отношении формирования гумуса почвы, весьма сходного по своему составу с меланиновыми

пигментами грибов. Это сходство проявляется как в элементарном составе гумуса и меланинов (Мирчинк, 1976), в среднем количестве азота между меланинами растений и животных, так и в других параметрах (экстинкция при $\lambda=465$ нм, молекулярная масса). Меланины грибов, судя по обилию в них азота, видимо, в значительной мере составлены из остатков ароматических аминокислот

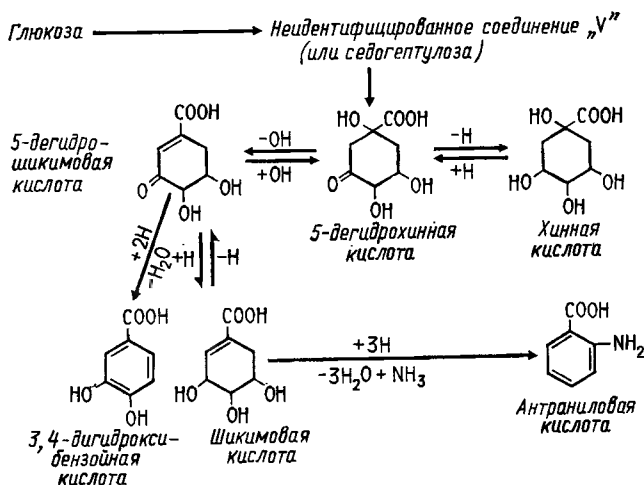
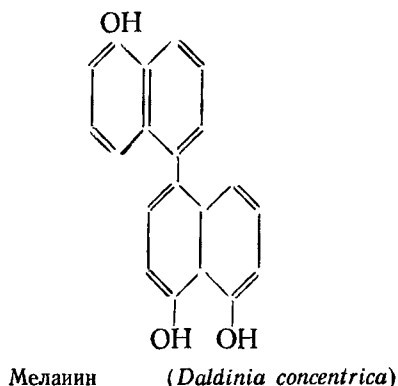


Рис. 3.14. Биосинтез ароматических соединений через шикимовую кислоту, изученный с помощью мутантов *Neurospora crassa* (Miller, 1961)

подобно индольным меланинам животных, хотя, вероятно, в них есть примесь и чисто углеродсодержащих типа меланина *Daldinia concentrica* (Allport, Bu'Lock, 1960) или пирокатехольного меланина высших растений (Жданова, 1976).



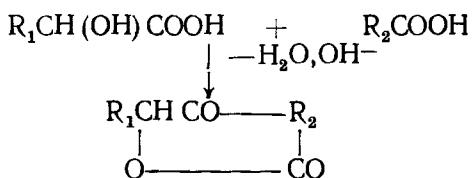
Сравнительный элементарный состав меланина показал, что он содержит приблизительно от 1 до 4% азота против 0,7% в мела-

нине высших растений и от 5 до 9% — в меланине животных (Мирчинк, 1976; Лях, Рубан, 1972). Безазотистый меланин грибов, вероятно, синтезируется подобно стеролам в шунте терпенов, тогда как синтез индольного меланина, видимо, относится к азотному обмену и протекает по пути, изученному у животных, исходящему из шикимовой кислоты. Синтез последней описывался выше и подробно изучен на модели мутантов *Neurospora crassa*.

Путь биосинтеза индольного меланина исходит из тирозина и протекает с участием молекулярного кислорода и обильного у грибов фермента тирозиназы, трансформирующей тирозин сначала в диоксифенилаланин (ДОФА), затем в дофахинон и, наконец, после образования пятичленного азотсодержащего кольца, в 5,6-диоксииндол-2-карбоновую кислоту. Последняя при действии оксидазы трансформируется в красный пигмент ДОФА-хром со свойствами хинона, теряет карбоксильную группу, превращаясь в 5,6-диоксииндол, и окисляется затем в соответствующий хинон, способный в дальнейшем при окислении полимеризоваться, образуя меланин.

Пути образования меланина у паразита хлопчатника *Verticillium dahliae* (Bell et al., 1976; Sete, Yonohara, 1977; Stipanovic, Bell, 1977), у паразита риса *Piricularia oryzae* (Sisler, Tokousbalides, 1979) обобщены Сислером. Этот путь биосинтеза меланина исходит из ряда гидроксильрованных и окисленных нафталинов, как считалон и вермелон, из которых далее формируется 1,8-дигидроксинафталин, конденсирующийся в меланин. Угнетение трициклазолом образования меланина у *P. oryzae* не сопровождается подавлением синтеза сходного с его предшественниками токсина *P. oryzae* — пирикулярдиола, а, наоборот, усиливает его продукцию, что указывает на конкуренцию его биосинтеза с биосинтезом меланина.

Грибы способны образовывать и другие конденсированные соединения, например, имеющие характерное пятичленное лактонное кольцо тетрановой кислоты (Bu'Lock, 1961). Эти соединения образуются путем конденсации какой-либо оксикислоты, чаще молочной или яблочной, с другой кислотой, например уксусной:



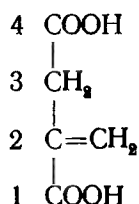
Особенно часто этот тип соединений встречается у видов рода *Penicillium* (*P. charlesii*, *P. viridicatum*, *P. terrestre*, *P. cinerascens*), хотя они есть и у других грибов (табл. 3.8).

В числе образуемых грибами органических кислот встречаются и такие, которые синтезируются путем дополнительных трансформаций кислот цикла Кребса. К таким относится образуемая *Asper-*

Тетроновые кислоты плесневых грибов (Вил'Lock, 1961)

Компоненты		Тетроновая кислота		Продуцент
оксикислота	кислота	формула	название кислоты	
Молочная	уксусная	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCO}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	γ-метилтетроновая	
Яблочная	3-кетогексаиновая	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCO}-\text{CHCOCH}_2\text{H}_7 \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	карловая	<i>Penicillium charlesii</i>
Яблочная	3-кето-6-гидрокси-гексаиновая	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCO}-\text{CHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	карловая	»
Молочная	3-кето-6-гидрокси-гексаиновая	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCO}-\text{CHCO}(\text{CH}_2)_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	карлевая	»
Молочная	3-кетoadипиновая	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCO}-\text{CHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	карлиновая	»
Яблочная	3-кетooк-таиновая	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2\text{CHCO}-\text{CHCOCH}_2\text{H}_{11} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \end{array}$	виридиновая	<i>P. viridicatum</i>
Молочная	3-кето-6-гидрокси-октаиновая	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CHCO}-\text{CHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CHCH}_2\text{H}_8 \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{CO} \quad \text{OH} \end{array}$	террестровая	<i>P. terrestris</i>
Изолейцин	ацетоуксусная кислота	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5\text{CHCO}-\text{CHCOCH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH} \quad \text{CO} \end{array}$		

gillus terreus и *A. itaenicus* итаконовая кислота, видимо, получающаяся в результате метилирования по второму углероду и окисления янтарной кислоты:



Она имеет большое практическое значение как сырье для изготовления синтетических полимеров. Очень часто встречаются у грибов также гетероциклические соединения с включением в углеродный скелет какого-либо другого атома, чаще всего азота или серы, или с перемежающейся конденсацией аминокислот с жирными кислотами, например, при синтезе антибиотиков рода *Fusarium*, носящих название депсипептидов.

АЗОТНОЕ ПИТАНИЕ ГРИБОВ. ФУНКЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ АЗОТА В МИЦЕЛИИ ГРИБОВ И ИХ БИОСИНТЕЗ

1. Азотное питание грибов

По сравнению с фотосинтезирующими организмами в мицелии грибов азота намного больше и азотный обмен у них сильно развит, хотя по объему затрачиваемого на него материала уступает углеродному. Азота в мицелии грибов содержится в 5—6 раз меньше углерода. Однако в питательных средах приходится поддерживать соотношение C/N порядка 40/1 (например, в среде Чапека), что объясняется использованием соединений углерода в качестве источника энергии. Вследствие этого углерод в сравнительно небольшой степени удерживается мицелием, тогда как азот, за немногими исключениями, когда его соединения служат источниками энергии (окисление аммиака или переработка дезаминированных аминокислот), остается в нем целиком.

Азот у грибов входит в состав оболочки (в хитин и хитозан), в белки, пептиды и аминокислоты, в витамины, в большую часть кофакторов и в белковую часть ферментов, в пурины и пиримидины, т. е. в основания нуклеиновых кислот.

По характеру их питания азотом Роббинс делит грибы на четыре группы, использующие:

- 1) органический азот, NH_3 , NO_3^- и N_2 (т. е. газообразный азот атмосферы);
- 2) органический азот, NH_3 и NO_3^- ;
- 3) органический азот и NH_3 ;
- 4) только органические соединения азота.

Усвоение атмосферного азота грибами. По имеющимся в научной литературе данным, усваивать атмосферный азот способна сравнительно узкая таксономическая группа грибов, образующих эндотрофную микоризу, относящаяся к родам *Phoma* (у вересковых растений) и *Rhizoctonia* или *Orcheomyces* (у орхидных — *Neottia nidus avis* и других).

Первые данные по фиксации азота у *Phoma betae* были получены в 1901 г. Саида. Далее более детально этот вопрос был изучен в 1907 г. Тернетцем, который установил эту способность имеющимися в то время в его распоряжении методами для пяти разновидностей *Phoma radidis*, представляющих собой симбионтов брусники, клюквы, вереска, подбела и *Tetralicus*. К подобным, содержащим эндотрофную микоризу из рода *Phoma*, растениям можно, видимо, сейчас отнести также рододендрон, багульник и пуштынный кустарник казуарину.

Усвоение азота у трех разновидностей *Phoma* по данным Тернетца, оказалось не уступающим *Azotobacter*, и составляло от 10,92

до 22,14 мг азота на 1 г использованной глюкозы, при параллельно испытанной энергии усвоения атмосферного азота у *Azotobacter* порядка 10,66 мг азота на 1 г глюкозы. Позднее доказывалось усвоение азота атмосферы у *Phoma casuarinae*, причем в этих целях был использован меченый азот при выращивании этого организма на синтетической среде с сахарозой в атмосфере газовой смеси, содержащей кислород и изотоп азота $^{15}\text{N}_2$. Более поздние опыты с этой культурой не подтвердили предшествовавших данных, поскольку, по-видимому, они проводились с долго поддерживавшимся в искусственной культуре штаммом, который мог утратить способность усваивать азот.

У *Orcheomyces* (или *Rhizoctonia*), симбионта орхидных, усвоение азота оказалось близким по объему к *Azotobacter* (9,8—13,3 мг на 1 г усвоенной глюкозы), но для этого организма доказательства усвоения им азота менее убедительны. В последнее время есть сведения об усвоении атмосферного азота грибами из родов *Rhodotorula* и *Pullularia* (Nicholas, 1965). Анализ этой способности у образцов эктотрофных микориз из числа базидиомицетов привел к отрицательным результатам.

Вопрос об усвоении грибами атмосферного азота еще недостаточно изучен и окончательно не решен. Однако с точки зрения их экологии вряд ли можно сомневаться, что эта способность им присуща, в частности всем эндотрофным микоризам вересковых и многих других растений, характерных для примитивных северных, высокогорных и пустынных почв и бедных азотом торфяных формаций болот. Иначе нельзя было бы объяснить возможность существования в этих условиях порой очень мощной растительности (например, лиственничной тайги) в обстановке полного отсутствия бобовых растений и не выносящего кислого pH подзолистой и заболоченной почвы азотобактера. Все подлески таких растительных формаций состоят обычно из содержащих микоризу из рода *Phoma* вересковых: рододендрона, голубики, черники, брусники или багульника и клюквы. Взаимоотношения видов *Phoma* с их растениями-хозяевами, видимо, сходны со взаимоотношениями бобовых растений и клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium*.

Усвоение нитратного азота грибами. Большая часть грибов способна утилизировать ион NO_3^- как единственный источник азота. До 90% грибов усваивают ионы NO_3^- и NO_2^- , так как содержат систему ферментов, называемую нитратредуктазой. К их числу, например, принадлежит *Aspergillus niger* (Терентьева, 1966) или *Fusarium oxysporum* (Said, Harhash, 1966). Не усваивают нитраты только некоторые Saprolegniaceae (исключением из числа которых является использующая их *Apodachlya brachynema*), а также Blastocladales и некоторые высшие базидиомицеты. У них система нитратредуктаз, видимо, отсутствует.

Поскольку эта система является чаще адаптивной и развивается после определенной лаг-фазы, правильнее испытывать способность грибов к усвоению нитратов уже на заранее выращенном мицелии, отмывая его от первоначальной питательной среды перед

переносом в среду с нитратами (Nicholas, 1965). Тогда количество усваиваемого NO_3^- -иона может сильно увеличиться. На первом этапе усвоения иона NO_3^- происходит его восстановление в ион NO_2^- , который в аэробных условиях может накапливаться в среде в концентрациях до 10^{-3} — 10^{-2} моль/л и проявлять токсический эффект, мешающий дальнейшему усвоению нитрата (Walker, Nicholas, 1961). Например, рост *Neurospora crassa* ингибируется при достижении концентрацией NaNO_2 уровня $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л и выше, что сопровождается накоплением нитрита в мицелии. Подобное же наблюдалось и у дрожжей.

Существуют виды грибов, усваивающие ион NO_3^- лучше, чем ион NH_4^+ , например *Alternaria poonensis*. Не усваивает NO_3^- -ион *Penicillium ammoniophyllum*, описанный Шапошниковым и Мантейфель, и плохо усваивает ряд мукоровых грибов, среди которых находятся *Phycomyces blakesleeana*, *Rhizopus nigricans*, *Zygorhynchus moelleri*, виды *Absidia* и *Mucor*. Из числа базидиомицетов слабо усваивают нитраты виды *Marasmius*, *Lenzites trabea*, *Pleurotus ostreatus* и ряд других.

Усвоение грибами нитритов. Грибы более толерантны к иону азотистой кислоты, чем бактерии, что связано с их способностью переносить низкие значения pH. Большая часть видов грибов, усваивающих нитраты, усваивает и нитриты, если этому не препятствует токсичность HNO_2 , как в случае дрожжей и растущей в кислой среде *Cereospora* (Thind, Mandahar, 1965). Ион NO_2^- менее токсичен, чем сама азотистая кислота (HNO_2), поэтому в нейтральных средах усвоение этого источника азота усиливается. Хорошо используют нитрит *Fusarium niveum*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Coprinus* sp., *Rhizophlyctis rosea*.

У *Scopulariopsis brevicaulis* скорость усвоения нитрита соизмерима со скоростью усвоения нитрата и иона аммония, а именно составляет 1,2 мг азота на 1 г массы сухого мицелия в час. При добавке иона NH_4^+ в культуру *S. brevicaulis*, выросшего на среде с нитритом, усвоение последнего практически не подавляется и он используется параллельно иону аммония, т. е. этот гриб не утрачивает своей адаптации к нитриту. Наоборот, при добавке иона NO_2^- в культуру, выросшую на среде с аммонийным источником азота, азотистая кислота почти не используется, а ассимиляция иона NH_4^+ подавляется в течение двух суток, после чего оба иона используются с одинаковой скоростью. Эти эксперименты подтверждают адаптивность системы нитрат- и нитритредуктазы.

Усвоение иона аммония. Обычно слабо усваивают нитраты и хорошо ион аммония зигомицеты, ряд базидиомицетов и дрожжи. Барьер клеточной мембраны аммоний обычно преодолевает в форме недиссоциированного аммиака. Скорость проникновения соответствует градиенту его концентраций по обе стороны клеточной мембраны и скорости его потребления на биосинтез. Ход потребления аммония у грибов, например у *Penicillium griseofulvum* и *Fusarium graminearum*, сходен и протекает быстрее при более

высоком рН среды. Однако одновременно усвоение аммиака происходит тем быстрее, чем ниже внутриклеточное рН. Например, у *F. graminearum* и *Aspergillus niger* с их более низким рН внутри клетки оно происходит интенсивнее, чем у *S. brevicaulis* (Nicholas, 1965).

Усвоение азота сильно зависит от источника и объема углеродного питания. Так, при наличии слабо используемых источников углерода и NH_4^+ -иона, в качестве источника азота возможна интоксикация мицелия аммиаком. Такой случай наблюдается у *Myrothecium verrucaria*, рост которого в подобном сочетании угнетался даже в присутствии иона NO_3^- . Однако при добавке глюкозы он хорошо рос на винно-кислом аммонии или в сочетании сернокислого аммония с органическими кислотами. Сходные явления были обнаружены у *S. brevicaulis* (Morton, McMillan, 1954/табл. 4.1).

Т а б л и ц а 4.1

Рост мицелия и ассимиляция азота у *Scopulariopsis brevicaulis*, (Morton, McMillan, 1954)

Источники азота	Средняя масса сухой пленки мицелия (мг/на колбу)	Ассимилированный азот (в % от начального)	Конечное рН среды
KNO_3	200	100	8,0—8,1
NH_4NO_3	18	15—20	3,0—3,9
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12	15—20	2,7—3,8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + тартрат	160	100	3,4—4,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + малат	225	100	7,5—8,6

Подобный эффект органических кислот состоит в связывании поступающего в клетку аммиака, регуляции рН клетки и облегчении включения аммиака в аминокислоты.

Использование грибами смешанных источников азота. Общим явлением у грибов оказывается подавление ассимиляции иона нитрата при одновременном введении в среду иона аммония, тогда как введение иона NO_3^- не подавляет ассимиляции аммиака (Morton, McMillan, 1954).

В этом отношении сходно ведут себя такие виды, как *Scopulariopsis brevicaulis*, *Alternaria solani*, *Aspergillus repens*, *Botrytis allii*, *Cladosporium herbarum*, *Diplodia natalensis*, *Mucor rammannianus*, *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria* и *Penicillium chrysogenum*. Некоторые виды, к числу которых относятся *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Fusarium graminearum* и *Penicillium griseofulvum*, способны использовать ионы нитрата и аммония одновременно (Nicholas, 1965).

При неравномерном использовании ионов из вносимых в среду солей, как в вышеприведенных случаях с *Myrothecium verrucaria*, *Scopulariopsis brevicaulis*, а также с культурой *Piricularia oryzae*, вследствие более быстрого использования источника азота в форме

NH_4^+ -иона из сернокислого аммония, среда сильно подкисляется за счет остающегося в ней в избытке иона SO_4^{2-} . В результате этого может тормозиться рост гриба. Однако в случае *Piricularia oryzae*, рост может быть восстановлен при добавке в среду солей органических кислот как источник углерода, аммонийных солей (например, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) или нейтрализующего среду мела. Стабилизацией pH среды объясняют также благоприятное действие на усвоение иона NH_4^+ у *Aspergillus сукцината*. При его потреблении происходит нейтрализация среды (Agrihotri, 1966).

Использование смешанных источников азота, например аммонийной селитры (NH_4NO_3), значительно зависит от pH среды. *Aspergillus niger* при pH более 3,0 усваивает в первую очередь ион аммония, в более кислой среде преимущественно переходит к иону нитрата. Порог pH, равный 3,0, близко подходит к уровню изоэлектрической точки (ИЭТ) белка мицелия *A. niger*, т. е. к точке равновесной диссоциации анионов и катионов белка цитоплазмы. При pH ниже ИЭТ белок диссоциирует с избытком катионов, при pH выше ИЭТ — с избытком анионов. Поэтому в первом случае происходит преимущественная адсорбция белком цитоплазмы анионов, а во втором — катионов. Бюннинг и Роббинс продемонстрировали эти явления у грибов на модели адсорбции ими базофильных и ацидофильных красителей, имеющих соответственно окрашивающую часть молекулы в форме аниона или катиона, объяснив таким образом механизм преимущественного использования ионов в зависимости от pH среды и уровня ИЭТ и белков цитоплазмы.

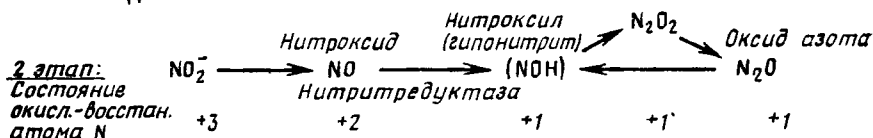
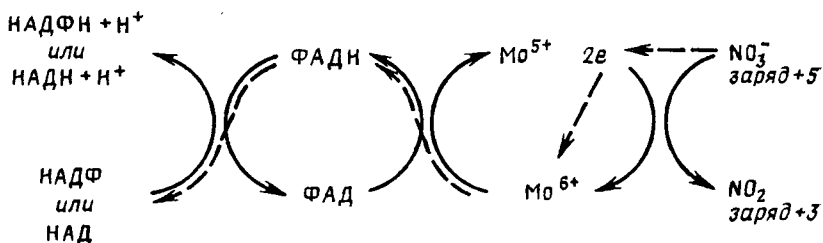
Эффект органических кислот в отношении облегчения усвоения аммиака сводится не только к его нейтрализации при поступлении в клетку. Вторая роль их состоит в облегчении включения его в аминокислоты путем трансформации их в соответствующие кетокислоты. Поэтому в основном усвоению иона NH_4^+ способствуют органические кислоты с четырьмя атомами углерода, как янтарная, фумаровая и винная, трансформирующиеся в аспарагиновую кислоту, а также с двумя и тремя атомами углерода, как молочная, пировиноградная и уксусная, дающие начало аланину и глицину. Применяют их в среде в концентрациях порядка 0,1—0,2%. Примером этого может служить благоприятное действие на усвоение иона аммония фумаровой кислоты у базидиомицетов и винной — у *Chaetomium globosum*.

2. Пути усвоения неорганического азота грибами

Общая схема усвоения нитрата грибами состоит из четырех этапов (рис. 4.1). В этой реакции участвуют промежуточные этапы переноса электронов, в которых обязательными компонентами являются молибден и флавопротеид (ФАД). Потеря нитратом двух электронов приводит к образованию нитрита, имеющего на два заряда меньше предыдущего.



Путь переноса электронов:



Путь переноса электронов

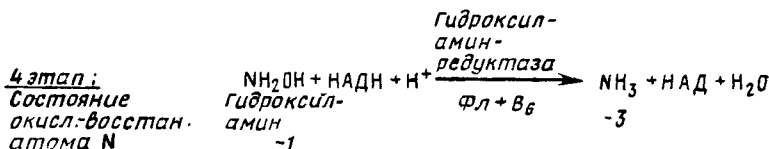
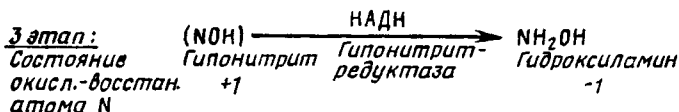
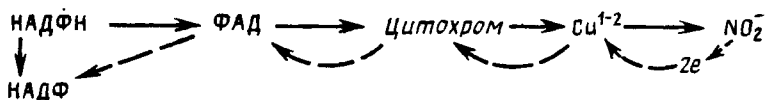


Рис. 4.1. Схема процесса усвоения нитратов грибами

Второй этап, осуществляемый ферментом нитритредуктазой, состоит в переходе с потерей молекулой еще двух электронов из нитрита в нитроксид (NO) и затем в нитроксил (NOH) или гипонитрит. На этой стадии возможен также переход без потери валентности из нитроксила (NOH) в N_2O_2 и далее в N_2O и обратно. Наличие этого промежуточного этапа подтверждается существованием у *Neurospora* зизима, восстанавливающего нитрит до ок-

сида азота (1) (Walker, Nicholas, 1961), причем у грибов показана способность усваивать это соединение (Nicholas, 1965). В процессах второго этапа восстановления неорганического азота участвуют как кофакторы НАДФ, ФАД, цитохром и ион меди.

Третий этап восстановления, протекающий с участием энзима гипонитритредуктазы, состоит в восстановлении гипонитрита до гидроксилamina. Гипонитритредуктаза была обнаружена у *Neurospora*, причем выяснилось, что кофактором ее является восстановленный НАД.

Четвертый этап состоит в восстановлении гидроксилamina до аммиака, протекающем с участием НАДН при действии фермента гидроксилaminредуктазы. Реакция восстановления гидроксилamina в аммиак была установлена у *Neurospora*. Энзим оказался так же, как и в двух первых этапах восстановления азота флавопротеином, нуждающимся в пиродоксине и в металлах, которые подавляются хелирующими агентами. Для синтеза гидроксилaminредуктазы оказались необходимыми марганец и магний, нужные также и для синтеза нитрит- и гипонитритредуктаз (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Действие дефицита металлов на активность нитрит-, гипонитрит- и гидроксилaminредуктаз *Neurospora crassa* (Medina, Nicholas, 1957)

Дефицитность металла	Масса сухого мицелия, г	Процент восстановления по сравнению с контролем		
		нитрита	гипонитрита	гидроксиламина
Fe	32	22	51	100
Cu	43	36	53	100
Mn	41	53	60	57
Mo	40	100	100	100
Zn	59	68	100	95

Для функции нитрит- и гипонитритредуктаз оказались необходимыми железо и медь, а молибден только для нитратредуктазы (Medina, Nicholas, 1957). Из других металлов для синтеза нитратредуктазы необходим также цинк.

Весь процесс восстановления нитрата в целом нуждается в следующих кофакторах: НАДФ (или НАД), ФАД, сульфгидрильных группах (табл. 4.3), в фосфате (сходный эффект дают также арсенит и пиродоксфат), а на этапе синтеза гидроксилaminредуктазы еще в пиридоксальфосфате. В последнем этапе возможно образование комплекса (промежуточного) с гидроксилaminом, в начале в форме оксима, а потом амина.

Пятый этап — утилизация аммиака для биосинтеза аминокислот — протекает при участии глютаминдегидрогеназы и состоит в аминировании α -кетоглутаровой кислоты с параллельным восста-

Общая схема потребности в компонентах редуказной системы при восстановлении нитрата и других соединений азота у грибов (Nicholas, 1965)

Донор водорода	НАДН или НАДФН
Кофакторы	ФАД пиридиксин
Потребность в металлах	Mo Fe Cu Fe
Состояние окисления-восстановления атома азота	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{+2e, +5} \text{NO}_2^- \xrightarrow{+2e, +3} (\text{NOH})_2 \xrightarrow{+2e, -1} \text{NH}_2\text{OH} \xrightarrow{+2e, -3} \text{NH}_3 \rightarrow \text{глутаминовая кислота}$ $\downarrow$ N₂ $\uparrow$ O₂
Потребность в фосфоре	возрастает
Потребность в SH-группах	возрастает

новлением ее кетогруппы ($\text{R}-\text{CO}-$) в группу $\text{R}-\text{CHNH}_2$. Такой энзим был найден у *Neurospora crassa* (Nicholas, 1965), причем было выяснено, что для его биосинтеза требуется цинк. У грибов глутаминдегидрогеназа — ключевой энзим для продукции органических соединений азота, и мутанты, не имеющие этого энзима (например, мутант *Neurospora* N 2003), не растут на средах с ионом аммония в качестве источника азота, а только на содержащих аминокислоты. Общая схема потребностей энзимов системы нитратредуктазы в различных кофакторах приведена в табл. 4.3.

Взросший в последнее время интерес к механизму азотфиксации прокариотными организмами привел к широкому ряду работ по общему изучению молибденсодержащих ферментов, в том числе и нитратредуктазы — первого комплекса энзимов в пути восстановления неорганического азота до аммиака, оказавшегося у прокариотов тесно связанным с фиксирующим азот воздуха ферментом нитрогеназой. При этом были затронуты и грибные организмы, в частности дрожжи *Rhodotorula glutinis* и дефектный по молибденовому компоненту мутант nit^{-1} *Neurospora crassa* (Ketchum et al., 1970; Ketchum, Sevilla, 1973; Pan, Nason, 1978).

Ассимиляторная нитратредуктаза эукариотов, осуществляющая двухэлектронное восстановление нитратов в нитриты, оказалась

двухкомпонентным комплексом из диафоразы, содержащей как кофакторы у грибов НАДФН (Львов и др., 1980), и терминальной молибденсодержащей нитратредуктазы (табл. 4.4). Промежуточ-

Таблица 4.4

Характеристика ассимиляторных нитратредуктаз грибов
(Львов и др., 1980)

Вид, из которого выделена нитратредуктаза	Молекул. масса · 10 ⁻³	Доноры электронов			Молибденат, моль	Кофактор	Оптимальный pH	Субъединичный состав
		НАДФН	ФМНН ФАДН	ферродоксин (метилвиологен)				
<i>Neurospora crassa</i>	230	+	+	+	1,59—1,74	ФАД <i>b</i> ₅₅₇	7—8	115 · 10 ⁻³
<i>Rhodotorula glutinis</i>	230	+	+	+			7,5	130 118,2

ным переносчиком между ними служит цитохром *b*₅₅₇, а вся схема переноса восстановленных эквивалентов на нитрат выглядит следующим образом:



Диафораза

Терминальная
нитратредуктаза

У прокариотов эта цепь ограничена двумя последними компонентами с донором электронов в форме ферродоксина или его химического аналога метилвиологена. Кофакторы молибденсодержащих ферментов оказались общими для целого ряда энзимов, таких как нитратредуктаза, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза, сульфитоксидаза и ксантиндегидрогеназа (Маккена и др., 1974; Львов и др., 1980). У *Neurospora crassa* этот кофактор оказался низкомолекулярным (Ketchum, Sevilla, 1973), что подтвердилось при самосборке ее нитратредуктазы (Pan, Nason, 1978), тогда как кофактор, входящий в состав нитрогеназы прокариотов, содержит не менее восьми атомов железа и шести атомов серы на один атом молибдена (Shah, Brill, 1977). Однако молибденовый компонент их нитратредуктазы в 2—4 раза ниже по молекулярной массе, чем у эукариот, и содержит не два, а только один атом молибдена (см. табл. 4.4). Исследования по нитратредуктазам и нитрогеназе еще не закончены и продолжают пополняться новыми сведениями.

Кроме нитратов грибы способны восстанавливать также и органические нитросоединения, например *м*-нитрозонитробензол в *м*-нитроанилин. Такая реакция описана у *Neurospora* (Nicholas, 1965), а восстановление *п*-нитробензола у *Aspergillus niger*.

У грибов установлено так называемое азотное дыхание, т. е. окисление соединений азота, возможной целью которого является получение энергии, аналогичное подобному процессу у бактерий нитрификаторов (Nicholas, 1965). Материалом для этого окисле-

ния служит аммиак, выделяющийся в результате дезаминирования аминокислот, и обнаруживают эту способность чаще всего у почвенных гифомицетов, обитающих в условиях южных пустынных почв, бедных источниками углерода (*Aspergillus flavus*, *A. wentii*, *Penicillium atrowenatum*). Процесс окисления, видимо, идет у них в направлении, обратном процессу восстановления нитратов, так как среди промежуточных продуктов его обнаруживаются гидроксилламин и нитрит, а заканчивается процесс образованием нитрата. Впрочем, энергетическое значение этого процесса в настоящее время подвергается сомнению (Мирчинк, 1976).

3. Усвоение органического азота, синтез и использование аминокислот

Органический азот усваивается главным образом в форме аминного азота аминокислот, пептидов и белков. Белки и пептиды перед усвоением расщепляются протеолитическими ферментами, аминокислоты могут усваиваться целиком. Рост грибов лучше обеспечивается смесью аминокислот, чем отдельными из их числа. Неспособны использовать ион NH_4^+ , и нуждаются в готовых аминокислотах некоторые хитридиомицеты и оомицеты, например *Blastocladiella emersonii*, *Sapromyces elongatus* и *Leptomitus lacteus*, а также *Saprolegnia parasitica*. Из других групп грибов нуждаются в готовых аминокислотах в основном паразиты, как *Ophiobolus graminis* или *Trichophyton mentagrophytes*. Лучше всего они используют содержащий смесь аминокислот гидролизат казеина. Дрожжи также лучше используют аминокислоты, чем ион аммония или нитрат. Бывают случаи, когда усвоение одних аминокислот угнетается присутствием в среде других (Nicholas, 1965). Усвоение аминокислот зависит также от возраста культуры, от pH культуральной среды и от концентрации в ней аминокислот, как это было показано методом изотопов для *Botrytis fabae*.

Аминокислоты с более короткой цепью лучше усваиваются грибами, чем с длинной. Например, аспарагин хорошо усваивается видами рода *Aspergillus* (Agnihotri, 1966), аланин *Fusarium oxysporum* (Said, Harhash, 1966). L-изомеры обычно усваиваются значительно лучше, чем D-изомеры или рацематы, так, это наблюдается у миксомицетов (Cotter, Raper, 1966) или у *Phytophthora parasitica* и *Verticillium albo-atrum*, плохо усваивающих D-аланин. D-аминокислоты не могут быть прямо включены в обмен как природные L-формы и обычно используются после их дезаминирования с помощью оксидазы D-аминокислот и трансформируются в кетокислоты, что осуществляется с различной скоростью для разных компонентов их смеси. При усвоении L-аминокислот, видимо, принимает участие система окислительного фосфорилирования, так как ингибиторы этой системы угнетают их потребление.

Такие первичные аминокислоты, как аланин и глутаминовая кислота, могут накапливаться в мицелии *Neurospora crassa* в больших количествах (Aurich, 1966), так же как и в уредоспорах

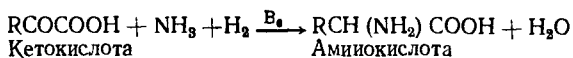
Puccinia graminis, что может зависеть от отставания процесса их включения в белки по сравнению с их ассимиляцией (Nicholas, 1965). Как единственный источник азота для роста *Fusarium oxysporum* лучшими аминокислотами являются аспарагиновая, глутаминовая и β -аланин, т. е. первичные (Wolf, 1955). Способность использовать их как единственный источник азота может варьировать даже в пределах близких родов. Например, дрожжи из рода *Saccharomyces* используют как источник азота меньший круг аминокислот, чем дрожжи рода *Torula*. Амиды соответствующих аминокислот обычно используются лучше, чем они сами. Так, аспарагин является лучшим источником азота, чем аспарат, в частности для *Tricholoma imbricatum*, *Piricularia oryzae*, *Leptographium* sp. и *Phycomyces blakesleeianus*. Глутамин хорошо утилизируют *Tricholoma gambosum* и другие базидиомицеты. Аспарагин способствует развитию перитециев у *Diaporthe phaseolarum*. Нуждаются в органическом азоте для споруляции и некоторые другие виды, например *Alternaria poonenensis*.

Серосодержащие аминокислоты обычно плохие источники азота, даже для нуждающихся в органическом источнике серы в виде метионина видов *Allomyces* и *Phytophthora* (Machlis, Craseman, 1956). Худшими, чем аминокислоты, источниками азота являются нуклеиновые кислоты и их производные. Из числа нуклеиновых оснований *Fusarium oxysporum* лучше используют пурины, чем пиримидины, пиримидиннуклеозиды, чем пиримидиннуклеотиды, и свободные основания. Так, *Fusarium oxysporum* лучше утилизирует цитидин и уридин, чем цитидиловую и уридиловую кислоты, и РНК лучше, чем ДНК, а *Neurospora* одинаково (Wolf, 1955).

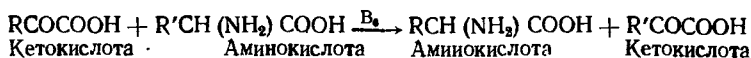
Специфичная потребность в определенных аминокислотах встречается у грибов сравнительно редко. Они могут усваивать азот даже из органических нитросоединений, например из нитрированных спиртов, CN- и CNS-групп. Последние группы используют иногда паразитические грибы, если они включаются в состав алкалоидов, свойственных их растениям-хозяевам.

Еще большее влияние, чем на усвоение иона NH_4^+ , на усвоение аминокислот оказывают дикарбоновые кислоты. Например, у *Phycomyces blakesleeianus* на среде с аргинином вес достигал 43 мг, а при добавке в эту среду 0,1% ятарной кислоты — 192 мг. Видимо, при этом легче происходит биосинтез набора аминокислот, образующихся в результате реакции переаминирования и участвующих далее в биосинтезе протеинов. Вторая функция дикарбоновых кислот состоит в нейтрализации получающегося при дезаминировании аминокислот избытка аммиака. Сходная причина, т. е. степень легкости использования в реакциях переаминирования, лежит в основе наблюдавшегося Стейнбергом явления градации степени пригодности аминокислот как единственного источника азота (Steinberg, 1942). Из 22 испытанных им аминокислот наилучшими оказались 7: аланин, аспарагиновая кислота, аргинин, глицин, глутаминовая кислота, пролин и оксипролин, которые были названы первичными. Стейнберг предполагал, что остальные

Синтез амінокислот у грибів:



Переаминирование (трансаминирование):



Например:

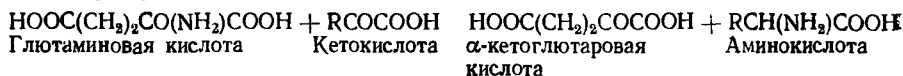


Рис. 4.3. Схема процессов синтеза аминокислот у грибов и переаминирования

зов аминокислот был изучен на моделях мутантов *Neurospora* и других грибов.

В последнее время аминокислотный состав плодовых тел и культивируемого мицелия грибов привлек большое внимание в связи с использованием их как пищевых и кормовых ресурсов. При этом выяснилось, что и те и другие обладают вполне полноценным набором аминокислот, в том числе и незаменимых. Примером этого может служить работа Р. А. Масловой (1978) по анализу аминокислотного состава плодовых тел и культивируемого мицелия ряда грибов-трутовиков, среди которых ею были изучены *Trametes suaveolens*, *Cariolus zonatus*, *Laetiporus sulphureus*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Lenzites betulina* и *Coltricia perennis* (табл. 4.5).

Таблица 4.5

**Аминокислотный состав мицелия грибов-трутовиков, выращенных
на среде с пептоном и глюкозой (в % на сухую массу)
(Маслова, 1978)**

Аминокислоты	<i>Trametes suaveolens</i>	<i>Coriolus zonatus</i>	<i>Lenzites betulina</i>	<i>Coltricia perennis</i>	<i>Laetiporus sulphureus</i>
Аланин	3,4	4,0	2,5	2,9	3,2
Аспарагиновая	2,9	4,4	3,4	2,6	3,6
Аргинин	1,6	2,1	1,1	1,5	1,9
Валин	2,6	3,1	1,5	2,8	1,2
Глицин	1,8	2,9	1,4	2,2	2,1
Глутаминовая	5,8	6,2	4,4	4,8	5,9
Гистидин	1,2	1,6	1,1	0,9	1,6
Лейцин	3,9	4,4	3,6	3,0	3,9
Лизин	1,5	2,1	1,5	1,2	2,2
Метионин	1,9	0,6	1,2	1,6	2,1
Серин	2,4	2,1	2,0	1,4	2,1
Тирозин	1,1	2,0	1,3	1,1	1,2
Триптофан*	—	—	—	—	—
Пролин	0,8	1,3	1,2	0,9	1,4
Треонин	2,4	1,4	2,0	2,4	2,6
Фенилаланин	2,1	1,9	2,2	2,2	2,9

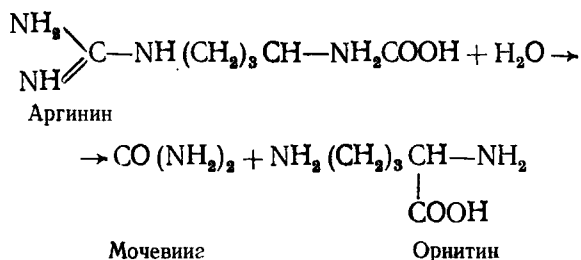
* Триптофан найден только в плодовых телах.

При этом, что особенно важно, у культивируемого мицелия максимум накопления большинства аминокислот, судя по примеру *T. suaveolens*, достигался уже на восьмые — девятые сутки роста, что практически вполне приемлемо, хотя и уступает скорости роста специально отобранного для пищевых целей штамма *Polyporus squamosus* А. К. Торева (1975).

Количество отдельных аминокислот в мицелии среди культур, испытанных Р. А. Масловой, достигало у преобладающих в гидролизате, как аланин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты и лейцин, 4—5% от сухой массы мицелия. Лизина накапливалось порядка 2%. Не хватало в гидролизате культивируемого мицелия только присутствовавшего в гидролизате плодовых тел триптофана (табл. 4.5).

4. Метаболизм и роль мочевины у грибов

Конечным продуктом распада белка у живых организмов могут быть аммиак и диамид угольной кислоты или мочевина, которая занимает в обмене грибов совершенно особое и специфичное место. Иллюстрацией процесса биосинтеза мочевины у грибов служит образование ее из аргинина по следующей схеме:



Может она образовываться, например, у дрожжей также из нуклеиновых оснований (рис. 4.4/Di Carlo et al., 1952).

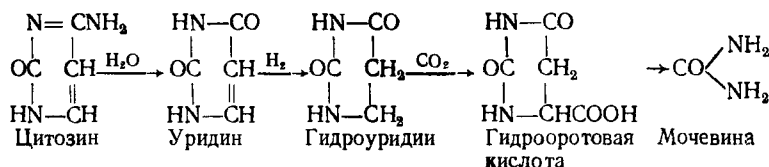


Рис. 4.4. Образование мочевины у дрожжей из пиримидиновых оснований

У животных мочевина представляет собой конечный продукт распада белка, выключаемый из обмена, тогда как у грибов она имеет совсем другое значение. Мочевина широко распространена у грибов и обильно накапливается в мицелии, особенно у гименомицетов в период созревания плодовых тел и особенно в их гимении. Обмен мочевины у грибов подробно изучался в многочислен-

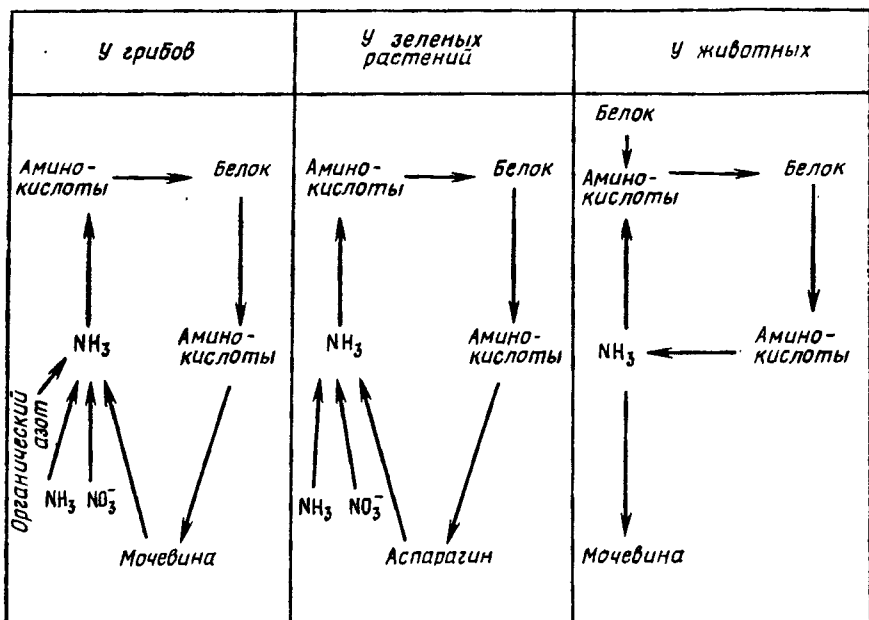


Рис. 4.5. Схемы, сравнивающие метаболизм мочевины и запасных аминокислот у животных, фотосинтезирующих растений и грибов

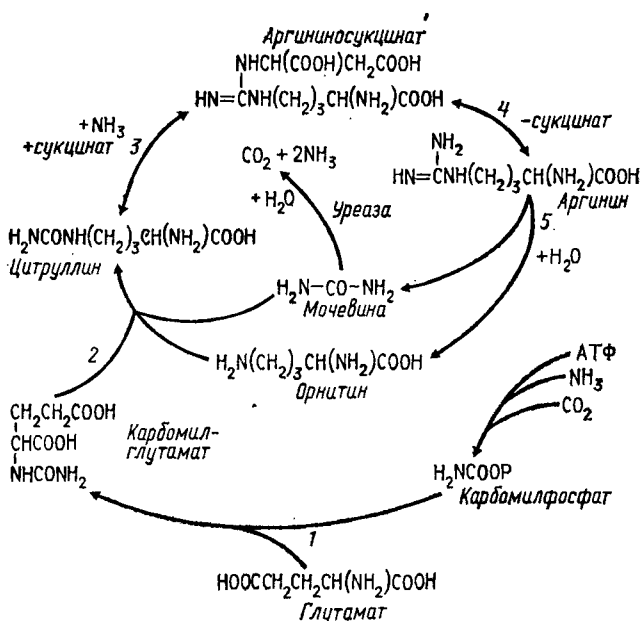


Рис. 4.6. Схема процесса биосинтеза аргинина и образования мочевины

ных работах Иванова, относящихся к двадцатым годам нашего века (Иванов, 1928; Иванов и Цветкова, 1936). Особенно большое количество мочевины было им обнаружено в плодовых телах дождевиков: *Lycoperdon* содержал ее до 10% от сухой массы, *Bovista* — до 12%, а шампиньоны еще больше. При помещении созревшего плодового тела в атмосферу аммиака количество мочевины в гимении повышалось до 14%. Однако в растворе сахара мочевина исчезала, расщепляясь ферментом уреазой до углекислоты и аммиака, который расходовался затем на синтез аминокислот и протеина, сопровождавшийся ростом плодового тела. Из этого можно было сделать вывод, что мочевина представляет собой у грибов запасное вещество с функцией, аналогичной функции аспарагина и глутамина у высших зеленых растений, у которых количество аспарагина повышается в темноте при отсутствии синтеза углеводов и уменьшается, расходуясь на синтез белка и рост, при новом поступлении углеводов.

Принципиальные различия в азотном обмене у животных, где мочевина является отбросом, у грибов, где она имеет функции запасного продукта, и у растений, где эту функцию несет аспарагин, приведены на рис. 4.5.

Особое значение мочевина имеет в биосинтезе аминокислот аргининового цикла, входящих в состав гистонов, основных белков, играющих ведущую роль в процессах инициации репликации хроматина и стимуляции или репрессии транскрипции рибонуклеиновых кислот. Обмен в этом цикле идет по схеме рис. 4.6.

Этот цикл обратим на всех его этапах, а подобное направление биосинтеза подтверждено работами с применением мутантов *Neurospora* (Вагнер и Митчелл, 1958).

5. Процессы трансметилирования и образования аминов у грибов

В области соединений азота для грибов не менее специфичны, чем синтез мочевины, синтезы аминов и азотсодержащих спиртов, альдегидов и кислот, видимо, играющих у них экологическую роль, связанную с влиянием на проницаемость мембран. Из соединений этого типа у грибов широко распространены холин и его производные — ацетилхолин и мускарин из *Amanita muscaria*, бетаины (Андреева, 1967), многочисленные летучие амины базидиомицетов (List, 1958; Stein von Kamienski, 1958) и целый ряд других соединений сходного типа, как например серотонин у *Panecolus campulatus* и близкие к нему по строению псилоцибин из *Psilocybe mexicana* (Hofmann и др., 1958, 1959) и буфотенин из видов мухомора (Wieland, Motzel, 1953).

Путь образования аминов у грибов пока не вполне ясен. Вероятно, у грибов он ближе всего к пути формирования их у животных и происходит при участии моноаминоксидазы (МАО, по терминологии медиков). Примером такого процесса может служить образование гистамина из гистидина. Процессы трансмети-

лирования, участвующие в образовании ряда веществ типа производных холина и серотонина, служат одновременно для образования многих антибиотиков, а также из урацила или цитозина, тимина и пиримидинового компонента витамина В₁. Процессы трансметилирования и биосинтез аминов связаны в едином метаболическом цикле, где донорами метильных групп являются либо пул фолиевой кислоты, либо метионин, а переносчиками метильной группы — *s*-аденозилметионин (SAM) или производное холина — бетаин. Детали всего обменного пула формирования аминов, азотсодержащих спиртов и метильных производных объединены в схеме на рис. 4.7.

Как показали миланские биохимики (Ciusa, Barbiroli, 1962), SAM является в организме животных агентом детоксикации очень многих токсических циклических соединений. Он функционирует и у бобовых растений, в результате чего в них накапливается тригонеллин и гомарин. Поскольку последние соединения встречаются и у грибов, видимо, реакции с участием SAM функционируют и у них.

Участие процесса трансметилирования в биосинтезе нуклеиновых кислот было обнаружено в опытах на мутантах *Neurospora crassa*, у которых при метиониновом голодании наблюдались снижение на 30% биосинтеза РНК и пониженный синтез белка. В качестве одного из продуктов обмена этого цикла в других опытах на мутантах *N. crassa* был обнаружен ацетилгомосерин, вероятно, являющийся побочным продуктом биосинтеза метионина. С биосинтезом аминокислот и простейших пептидов связано образование многих полипептидных антибиотиков и токсинов грибов, например трипептида пенициллина, дипептида лакомарамина и других.

Как можно видеть из рис. 4.7, биосинтез аминов у грибов тесно связан с формированием бетаинов и холина, которые встречаются у них в значительных количествах. Примером этому могут служить анализы содержания бетаинов (Андреева, 1967) и холина (Корякина, 1967) в плодовых телах высших базидиомицетов. При исследовании около 60 видов этих грибов, входящих в порядок *Agaricales*, особенно богатыми бетаинами оказались содержащие их от 4 до 5% от сухой массы четыре вида рода *Boletus*, в особенности белый гриб *Boletus edulis*, а также два вида сыроежек и мухомор *Amanita vaginata*.

Холина в высших базидиомицетах оказалось примерно в 10 раз меньше, чем бетаинов, и его количество колебалось сильнее (от 0,075 до 0,9% от сухой массы). Наиболее обильно он был представлен у рода *Ramaria* из порядка *Aphylllophorales* (0,6—0,9%), у *Boletus edulis* и некоторых видов *Lactarius* (0,7—0,8%) из порядка *Agaricales* (Корякина, 1967).

На азотном обмене грибов довольно хорошо прослеживается вероятная эволюция их обмена в направлении усложнения участвующих в нем ферментных систем. С этих позиций их можно сгруппировать в три основные категории.

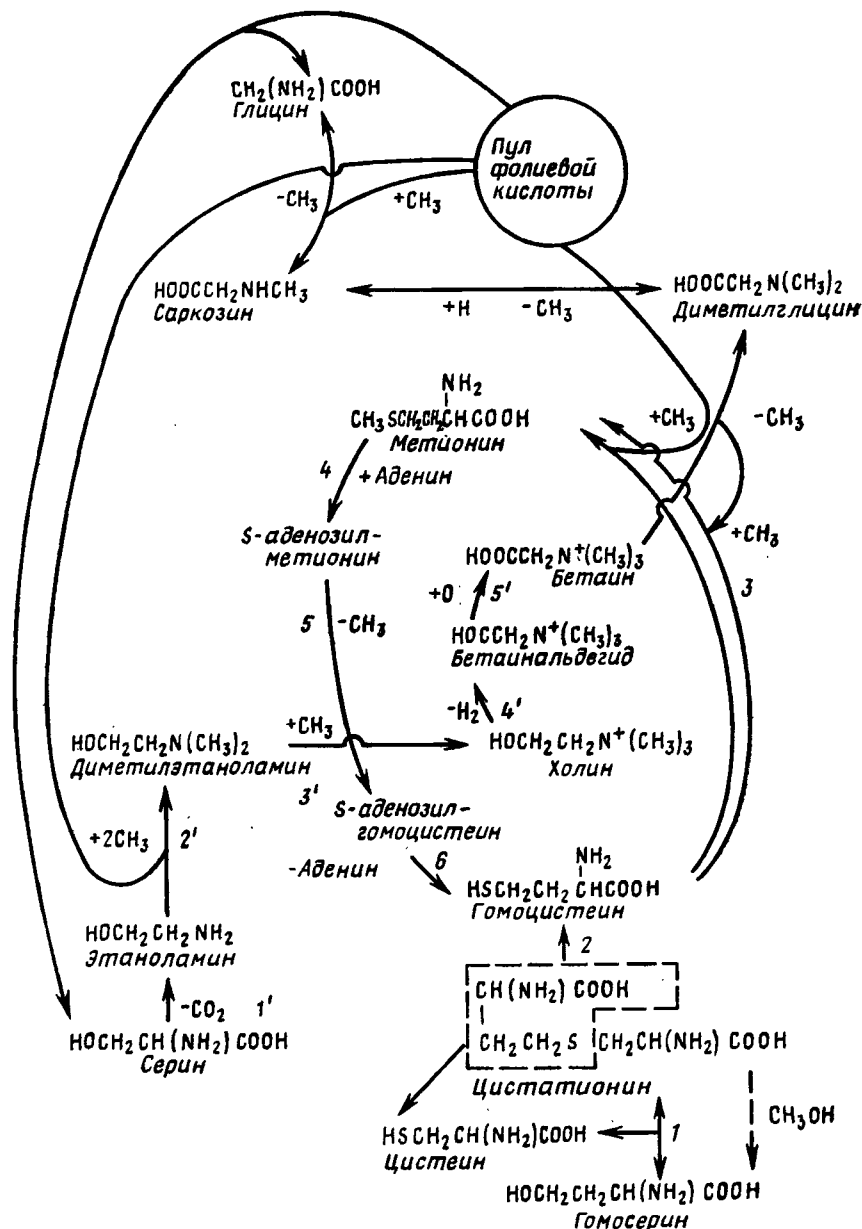


Рис. 4.7. Биосинтез аминов и холина при участии системы трансметилирования

1. Формы с отсутствием системы нитратредуктазы, с редуцированным циклом Кребса и отсутствием ферментов переаминирования и глутаматдегидрогеназы. Они могут использовать только

готовые наборы аминокислот. Сюда относятся в основном низшие грибы, а именно ряд форм из оомицетов и хитридиомицетов, с трудом выращиваемые в культуре.

2. Формы, способные синтезировать аминокислоты из аммиака и кетокислот, обладающие хорошо развитым циклом трикарбоновых кислот, но лишенные нитратредуктаз и отсюда слабо растущие или не растущие на средах с нитратом. Сюда можно отнести зигомицеты и некоторые низшие сумчатые грибы, например дрожжи.

3. Формы с наиболее сложным азотным обменом, имеющие вполне развитую систему нитратредуктаз и способные использовать все виды источников азота — органические, аммонийные соли и нитраты. Сюда относится большинство грибов: почти все базидиальные, высшие сумчатые и происшедшие от них дейтеромицеты.

Исключение из такого порядка иерархии составляют в основном формы со вторично упрощенным обменом вследствие обитания в условиях симбиоза или паразитизма. Системы протеолитических и запасавших энергию в форме фосфорных связей энзимов существуют у всех и начинают функционировать на наиболее ранних фазах их развития, что указывает на их наибольшую древность в филогении обмена веществ грибов.

ВИТАМИННОЕ ПИТАНИЕ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ В ОБМЕНЕ ГРИБОВ

1. Общие сведения и потребности грибов в витаминах

Кроме углерода, азота и зольных элементов многие грибы нуждаются в витаминах или в других факторах роста. Особенностью витаминов считают то, что в большинстве случаев они образуются зелеными автотрофными растениями и необходимы гетеротрофным организмам — животным и микроорганизмам, но последние нередко сами накапливают их в большом количестве и могут служить их источниками. Нуждающиеся в витаминах организмы называют ауксогетеротрофами, не нуждающиеся — ауксоавтотрофами.

Под собственно витаминами подразумевают обычно вещества, требующиеся в очень низких концентрациях: от 0,0001 до 1 мкг/мл (табл. 5.1). Исключение составляет только мезоинозит, необходимый в дозах от 1 до 2 мкг/мл.

Таблица 5.1

Сравнение активности четырех факторов роста в отношении их эффективных доз для грибов (Fries, 1965)

Факторы роста	Количество фактора роста, необходимое для образования 1 мг сухого мицелия в 1 мл	Низшая концентрация фактора роста, дающая максимальную скорость роста, мкг/мл
Биотин	0,00025	~0,0001
Тиамин	0,0004—0,0025	~0,001
Пиридоксин	0,0003—0,0007	~0,001
Инозит	1,1—1,7	~0,05

Витамины обычно обладают следующими свойствами: по строению это низкомолекулярные органические соединения, эффективны в очень малых дозах, имеют специфическое действие на определенные этапы обмена веществ, что объясняется их функциями как кофакторов (или простетических групп) ферментов.

Все витамины обычно делят на две большие группы: 1) водорастворимые, в них входят витамины группы В и витамин С (аскорбиновая кислота), сюда же примыкают аминокислоты и нуклеотиды, 2) жирорастворимые, включающие витамины А, D, К, Е и другие (Fries, 1965).

Не нуждается в витаминах большая часть почвенных грибов (роды *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium globosum*) и некоторые фитопатогенные грибы, особенно из сумчатых и несовершенных (Лилли, Барнетт, 1953). Исключение составляет

встречающийся на фруктах *Penicillium digitatum*, нуждающийся в тиамине и в меньшей степени в пантотеновой кислоте, пиридоксине и биотине. Потребность в витаминах может быть абсолютной (когда гриб практически не растет без витамина) и относительной. В последнем случае действие витамина выражается в сокращении лаг-фазы, увеличении скорости роста или в увеличении интенсивности роста, т. е. в получении большого количества биомассы (Fries, 1965).

Потребность в витаминах у грибов может ограничиваться всего одним или может быть комплексной, включающей до 5—7 различных витаминов. Иногда витамины могут быть заменены их предшественниками (пантотеновая кислота ее компонентом β -аланином, тиамин составляющими его пиримидином и тиазолом и т. п.). Можно также компенсировать недостаточный синтез данного витамина путем введения в среду продукта, образующегося при его участии, например необходимой для обмена аминокислоты.

Некоторые ингибиторы метаболизма могут вызвать у грибов потребность в витаминах, не выявляющуюся в отсутствие этих ингибиторов. У *Aspergillus niger* потребность в *n*-аминобензойной кислоте (ПАБ) возникает только в присутствии ее синтетического аналога — сульфаниламида. Существуют также одинаковые потребности в витаминах у целой группы грибов, например, в полной молекуле тиамина у многих видов рода *Phytophthora*. В то же время в роде *Torulopsis* у одних видов наблюдается полная аукоавтотрофность, у других потребность в количестве до трех-четырех витаминов. Особенно тесной связи между потребностями грибов в витаминах и их экологией не наблюдается. Однако грибы, обитающие в ризосферах растений, больше нуждаются в витаминах, чем растущие вне ее в почве. Аукогетеротрофность также бывает связана с паразитизмом, симбиозом или антропогенным фактором. Например, долго культивировавшиеся человеком дрожжи (промышленные расы *Saccharomyces cerevisiae* и т. п.) обладают намного большей потребностью в витаминах, чем дикие. Отсюда можно заключить, что у большинства грибов эволюция шла в основном в сторону аукогетеротрофности и что аукоавтотрофность является первоначальной, во всяком случае в пределах установившихся больших таксономических групп (например, сумчатые и базидиальные). Это, вероятно, связано с их широким проникновением в экологические ниши паразитизма и симбиоза. Обратная изменчивость в сторону аукоавтотрофности у грибов наблюдается сравнительно редко.

Иногда гетеротрофность в отношении витаминов наблюдается на ранних стадиях развития: в процессе прорастания спор и в первых этапах роста. Такое явление наблюдалось у *Myrothecium verrucaria*, реагирующего на витамины только в начале развития, тогда как дальнейший рост его мицелия не нуждается в витаминах. Это может говорить об адаптивном характере биосинтеза данного витамина. Примеров доказательства адаптивности биосинтеза витаминов у грибов довольно много. Так, для *Histoplasma*

capsulatum тиамин и биотин требуются только при развитии в дрожжевидной форме, тогда как развитие в форме мицелия возможно и в их отсутствие.

Потребность в факторах роста часто зависит от условий обитания грибов, например от температуры культивирования. Так, существует мутант *Neurospora*, нуждающийся в рибофлавине. Однако эта потребность выявляется у него только при температуре выше 25°C. Стимуляция роста *Coprinus fimetarius* метионином выявляется только при температурах более 40°C (Fries, 1951). *Saccharomyces cerevisiae* испытывает потребность в пантотеновой кислоте при температуре 38°C, но растет на синтетической среде без этого витамина при 30°C. *Aspergillus niger* нуждается в биотине и других факторах роста, когда его выращивают при температуре выше 42,7°C и вводят в среду в качестве источника углерода рамнозу (Fries, Källströmer, 1965).

Иногда потребность грибов в факторах роста может зависеть от состава, концентрации и уровня активной кислотности питательной среды. Например, *Pythium butleri* на среде с аспарагином при концентрации солей, равной 16,4 г/л, испытывает потребность в тиамине, тогда как при их концентрации в пределах 1,64 г/л эта потребность отсутствует. Зависимость потребности грибов в витаминах от pH среды может быть проиллюстрирована следующими примерами. *Sordaria fimicola* на кислых средах (с pH менее 4,0) нуждается в тиамине, тогда как при более высоком pH она растет без него. Существует также мутант *Neurospora crassa*, потребность которого в парааминобензойной кислоте зависит от уровня pH среды. Другой мутант *Neurospora*, полученный у вида *N. sitophila*, проявляет потребность в пиридоксине при росте на средах с нитратом и аминным азотом (аминокислотами), но на средах с солями аммония и в пределах pH 5,6—7,3 этой потребности у него нет, что объясняется зависимостью биосинтеза этого витамина от высвобождения аммиака, которое возможно только при данных уровнях pH (от 5,6 и выше).

Отсутствие потребности в витаминах при росте на среде с предшественником указывает на наличие блока в процессе его биосинтеза на ступени, предшествующей этому метаболиту. Такой случай наблюдается у *Trichophyton equinum*, для которого необходимая ему никотиновая кислота может быть заменена триптофаном. Если добавление в среду непосредственного предшественника витамина не улучшает роста, это обычно свидетельствует о том, что метаболический блок находится на последней ступени биосинтеза витамина. Подтверждение этого получают при добавке в среду веществ, необходимых для обмена и образующихся при участии этого витамина. Так, у *Pityosporium ovale* тиамин, в котором он нуждается, можно заменить добавкой в среду шавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислот, образующихся при участии декарбоксилирования, а у *Torula cremeris* добавкой аспарагиновой кислоты. Также и у *Ophiostoma pini* рост без биотина возможен в присутствии аспарагиновой и олеиновой кислот, а у *Neurospora*

crassa при использовании в качестве источника углерода вместо глюкозы, кислот цикла Кребса или фруктозы. Это явление довольно часто встречается у природных видов грибов и носит название «обхода» (by passing).

Иногда потребность в витаминах возникает в условиях анаэробно-биоза. Например, аукоавтотрофный в аэробных условиях *Mucor rouxii* в условиях недостатка кислорода нуждается в тиамине и пантотеновой кислоте. При большой стойкости этого признака потребности в витаминах в пределах вида можно использовать как критерий в систематике. Такие критерии использовались, например, при составлении ключей для определенных видов рода *Trichophyton*, рода *Rhodotorula* или рода *Exobasidium*.

2. Водорастворимые витамины группы В

Грибы особенно нуждаются в водорастворимых витаминах группы В и главным образом в тиамине.

Тиамин (витамин В₁, или анейрин). Отсутствие тиамина в пище вызывает у людей и животных заболевание полиневритом (бери-бери). В живых организмах он встречается в форме пирофосфата (рис. 5.1) и, кроме фосфорной кислоты, включает еще два компонента:

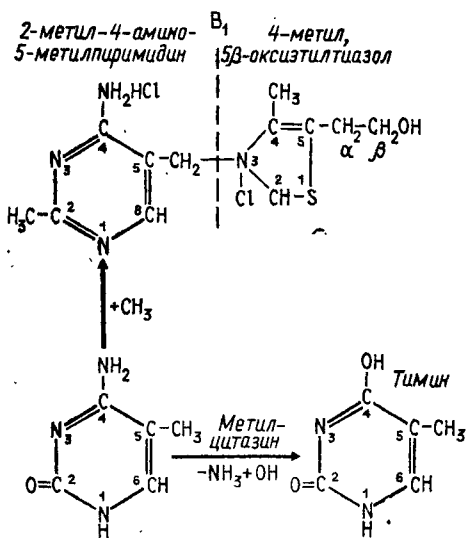


Рис. 5.1. Путь биосинтеза и структура витамина В₁ (тиамин)

2-метил-4-амино-5-метилпиримидин (или просто пиримидин) и 4-метил-5β-оксиэтилтиазол (или тиазол). Предшественником первого компонента скорее всего является метилцитазин, являющийся одновременно предшественником тиамин.

Потребность грибов в тиамине была впервые обнаружена одновременно Шопфером и Бургеффом в 1934 г. (Fries, 1965). Шопфер обнаружил, что урожай мицелия *Phycomyces blakesleeana* на среде с концентрацией тиамин 1·10⁻⁹ возрастает в 350 раз, а зиготообразование у этого гриба увеличивается в 750 раз. Обладающий аналогичным эффектом тиамин-

пирофосфат известен как кофактор всех видов карбоксилаз, производящих декарбоксилирование органических кислот в процессах гликолиза и в цикле Кребса, а также транскетолаз, переносящих двууглеродные фрагменты сахаров пентозного цикла, содержащих кетогруппы во втором положении.

Потребность в тиамине встречается у очень многих грибов из всех таксономических групп, включая оомицеты, сумчатые и базидиальные.

Большая часть грибов, нуждающихся в витамине В₁, могут синтезировать его из двух компонентов — пиримидина и тиазола (табл. 5.2). Лишь немногие роды и виды, среди них все виды

Таблица 5.2

Грибы, нуждающиеся в целой молекуле тиамина и в отдельных ее компонентах

Виды, нуждающиеся			
в целой молекуле тиамина	в пиримидине и тиазоле	в пиримидине	в тиазоле
<i>Klockera brevis</i> <i>Phytophthora</i> sp. <i>Trichophyton discoides</i>	<i>Phycomyces blakesleeianus</i> <i>Piricularia oryzae</i> Почти все гетеротрофные по тиамину виды	<i>Collybia tuberosa</i> <i>Coprinus</i> sp. <i>Marasmius fulvobulbosus</i> <i>Parasitella simplex</i> <i>Polyporus adustus</i> <i>Pythiomorpha</i> <i>Rhodotorula rubra</i> <i>Sclerotium oryzae</i> <i>Tricholoma</i> sp. <i>Ustilago longissima</i> и другие	<i>Endomyces magnusii</i> <i>Mucor rammanianus</i> <i>Stereum frustulosum</i> <i>Trichophyton concentricum</i>

Phytophthora, *Klockera brevis* и *Trichophyton discoides*, нуждаются в полной молекуле тиамина (Fries, 1965).

Третий вид гетеротрофии по тиамину состоит в потребности в пиримидиновой молекуле при наличии способности синтезировать ее тиазольную часть. Эта группа включает более десяти видов грибов. Наиболее малочисленны формы, неспособные синтезировать тиазол, среди которых в данное время насчитывается только четыре вида: *Endomyces magnusii*, *Mucor rammanianus*, *Stereum fructulosum* и *Trichophyton concentricum* (табл. 5.2).

Избыток тиамина в среде иногда вызывает угнетение роста грибов, что связывают с его функцией как кофермента карбоксилазы и с накоплением при ее избытке в культуре грибов этилового спирта в результате декарбоксилирования пирувата. В дальнейшем, при использовании спирта грибом, развитие его достигало нормального уровня. Подобные явления, обнаруженные впервые Фостером и Голдманом у *Rhizopus suinus*, были далее обнаружены у *Fusarium*, у *Ciborinia* и у *Saccharomyces carlsbergiensis*. У *Fusarium* этот эффект можно нейтрализовать биотином, у *Saccharomyces carlsbergiensis* пиридоксином, у *Rhizopus suinus* — мезоинозитом (Фостер, 1950). Наоборот, при недостатке тиамина в культуре нуждающихся в нем грибов наблюдается избыточное накопление в ней пирувата, которое можно выявить с помощью реакции образования йодоформа. При добавлении в среду йода в смеси с

йодидом калия и ее подщелочении при наличии в ней пировиноградной кислоты выделяется йодоформ, легко обнаруживаемый по запаху.

Биосинтез тиамина у грибов протекает, видимо, по пути вторичного метилирования метилцитозина и последующей конденсации пиримидиновой части молекулы тиамина с тиазольной. У некоторых видов источниками тиазольной части молекулы тиамина могут служить пенициллин или бацитрацин (Ebringer, 1960). Наличие тиамина необходимо для спиртового брожения, но у обычных дрожжей эта потребность проявляется только при pH 5,0, но не при pH 3,5. Практически тиамин можно получать из очень богатых им дрожжей; однако сейчас его чаще синтезируют химическим путем.

Рибофлавин, или витамин B₂, составлен из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола — производного рибозы (рис. 5.2). Его функции в обмене веществ состоят в участии в качестве кофер-

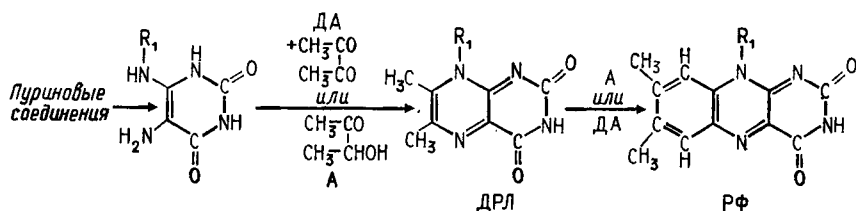


Рис. 5.2. Биосинтез рибофлавина у *Eremothecium ashyi* R₁ — остаток рибитола; ДРЛ — 6,7-диметилрибуломазин; РФ — рибофлавин; ДА — диацетил; А — ацетон

мента во всех флавиновых энзимах, а именно: 1) он является второй простетической группой ряда дегидрогеназ, а также оксидаз со строением гемов (Lindenmayer, 1965), где активной группой является флавинаденинмононуклеотид (ФМН), и 2) в форме флавинадениндинуклеотида он входит в состав глюкозооксидазы, т. е. принимает участие в первом этапе пути метаболизма гексоз через гексозомонофосфат (ГМФ), окисляя глюкозу и глюконовую кислоту. Кроме того, флавинадениндинуклеотид (ФАД) входит также и в состав сукцинатдегидрогеназы, окисляющей янтарную кислоту в фумаровую. Флавины входят также в систему нитратдегидрогеназ, лактатдегидрогеназ дрожжей и др. (Диксон, Уэбб, 1982).

Из природных видов грибов, обладающих потребностью в рибофлавине, известна *Poria vaillantii*, нуждающаяся также еще в тиамине, биотине и аденине (Jennison et al., 1955). Кроме нее существуют нуждающиеся в витамине B₂ мутанты видов *Aspergillus* и *Neurospora*. При этом потребность мутанта *Neurospora* в этом витамине выявляется только при температурах выше 25°C. У некоторых форм, не требующих этого витамина для роста, он оказывается влияющим на их спорообразование. К таким видам от-

носится *Alternaria solani* (Lukens, 1963). У *Fusarium aqueductum* он влияет на синтез каротиноидов (Rau, 1967).

Рибофлавин хорошо синтезируется многими грибами в больших количествах, вследствие чего они могут служить источниками для промышленного получения этого витамина, особенно представители семейства *Spermothoraceae* и некоторые дрожжи. В качестве промышленных продуцентов рибофлавина фигурировали в основном три вида: *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyia* (*Nematospora*) *gossypii*, *Candida guillermundii*, а также некоторые другие виды *Candida*. Для ферментации рибофлавина с помощью *Eremothecium ashbyii* используется среда, почти не содержащая углеводов (не более как от 0,25 до 1,5%), много животного белка или пептона (от 1 до 5%) и от 0,5 до 5% солодового экстракта как источника витаминов. При ферментации поддерживается температура от 27 до 30°C и производится искусственная аэрация. Начальное pH среды устанавливается на уровне 5,5. При этом на 1 мл культуральной жидкости образуется от 150 до 500 мкг В₂. Особенно сильное влияние на биосинтез рибофлавина оказывают пуриновые основания, пиримидиновое ядро которых, как это было показано в исследованиях с хроматографией меченных изотопами промежуточных продуктов этого биосинтеза, полностью включается в изоаллоксазиновое ядро рибофлавина. Путь биосинтеза рибофлавина от рибитилпурина с расщепленным имидазольным кольцом через 6,7-диметилрибуломазин до рибофлавина указан на рис. 5.2. В обоих этапах синтеза оказались участвующими ацетон или диацетил, постепенно надстраивающие на основе первоначального пиримидинового цикла два последующих кольца изоаллоксазинового ядра. При этом выяснилась необходимость постоянного присутствия в надстраиваемой молекуле спирта производного рибозы. В противном случае, при добавке в среду промежуточных продуктов реакции, биосинтез подавлялся.

Более широкое описание процесса биосинтеза флавиновых соединений и соотношения его с конкурентной системой биосинтеза веществ птеридиновой природы, входящих в пул фолиевой кислоты, даны в работе Ежевской (Jezewska, 1963/рис. 5.3). По данной ею схеме, и те и другие соединения исходят из инозинрибозофосфата, но путь синтеза флавинов идет через ксантиловую кислоту, а трансформация ИМФ в гуаниловую кислоту приводит к образованию соединений типа фолиевой кислоты.

Кроме рибофлавина, накапливающегося главным образом в культуральной жидкости, *Eremothecium ashbyii* может синтезировать флавинаденидинуклеотид, являющийся, так же как и рибофлавин, важным для медицины витамином. В отличие от рибофлавина флавинаденидинуклеотид (ФАД) концентрируется преимущественно в мицелии продуцента (табл. 5.3/Голышева, 1963), и выделяемый из него рибофлавин в основном приходится на содержащийся в ФАД (см. в таблице нижнюю строку, столбцы 4 и 6).

Кроме *Eremothecium ashbyii* для получения рибофлавина используют также близкую к нему форму *Ashbyia gossypii*. Для этого

вида имеются данные, что у него при росте на синтетической среде образование рибофлавина стимулируется ацетатом аммония и синтетическими поверхностно-активными эфирами жирных кислот (Goodman, Ferrera, 1954).

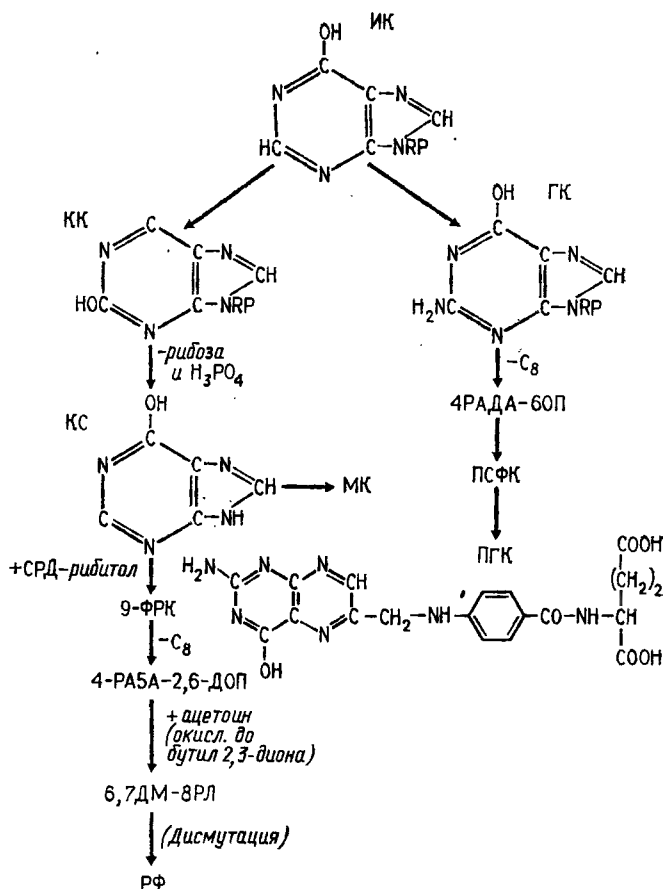


Рис. 5.3. Схема процесса биосинтеза птеридиновых и флавиновых соединений (Jezewska, 1963); ИК — инозиновая кислота; КК — ксантиловая кислота; ГК — гуаниловая кислота; КС — ксантии; МК — мочевая кислота; 9-ФРК — 9-фосфорибитилксантии; РР — рибозофосфат; 4-РА5А-2,6-ДОП — 4-рибителиамино-5-амино-2,6-диоксипиридины; 6,7-ДМ-8РЛ — 6,7-диметил-8-рибителилломазин; РФ — рибофлавин; 4-РАДА-6ОП — 4-рибозиламино-2,5-диамино-6-оксипиридины; ПСФК — птеридиновая система фолиевой кислоты; ПГК — птероилглутаминовая (фолиевая) кислота

Биотин, или витамин Н, представляет собой гетероциклическое соединение (рис. 5.4) с двумя сопряженными кольцами, включающими азот и серу, и боковой алифатической цепью. Он был выделен в форме самого витамина (у *Torula utilis*) или в форме его

Содержание ФАД и рибофлавина в мицелии и культуральной жидкости
Eremothecium ashbyii (Голышева и др., 1963)

Культуральная жидкость, мл	Выход мицелия, г	Общее содержание рибофлавина, мг			Выделено ФАД из мицелия, мг
		в культу- ральной жидкости	в мицелии	в фильтрате	
2340	132,8	555,7	282,6	292,5	40,8
2100	121,0	504,0	268,8	218,4	237,5

производных у целого ряда грибов — из *Penicillium chrysogenum* — дестиабиотин, из *Aspergillus niger* — биотин сульфоксид и у *Saccharomyces cerevisiae*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys atra* и *Candida albicans* в форме оксибиотина. В составе пируваткарбок-

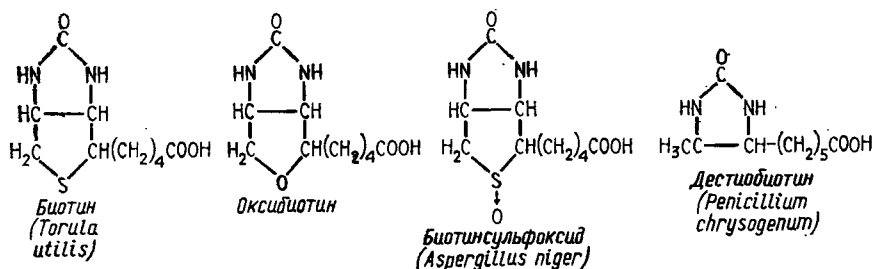


Рис. 5.4. Структура биотина и его аналогов, встречающихся у грибов

силазы живых организмов биотин находится в форме, связанной с белком пептидной связью через Е-аминогруппу лизина (Ленин-джер, 1974).

Хотя биотин и требуется в очень малых количествах, однако функции его довольно разнообразны. Известно, что он участвует в превращении орнитина в цитруллин, играет роль в усвоении аммиака и производит ряд реакций карбоксилирования, в частности превращение фосфоэнолпирувата в щавелевоуксусную кислоту и ацетата — в малоновую, при включении одной из них в цикл Кребса, а другой — в обмен жирных кислот. Известно, что щавелевоуксусная кислота при ее аминировании трансформируется в аспарагиновую. Поэтому *Torula cremoris* на среде с аспарагиновой кислотой значительно меньше нуждается в биотине, чем при росте на других средах. Биотин способствует использованию мочевины у *Saccharomyces cerevisiae*, входит в систему гексокиназы, участвует в дезаминировании некоторых аминокислот и в синтезе некоторых жирных кислот (Fries, 1965). Кроме *Torula cremoris* могут обходиться без биотина на среде с аспарагиновой кислотой *Stachybotrys atra*, *Candida albicans* и *Ophiostoma pini* (Perlman, 1965), причем у *Candida albicans* рост на среде без биотина воз-

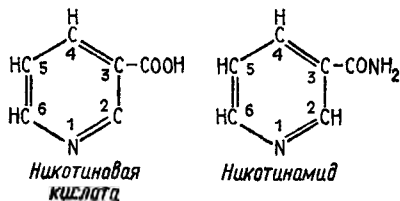
можен при введении в нее глицеринмоноолеата, а у *Ophiostoma pini* — олеиновой кислоты.

Эти особенности становятся понятными при учете роли биотина в образовании малоновой кислоты, являющейся исходным метаболитом при образовании ненасыщенных жирных кислот, в частности олеиновой. При недостатке биотина в культуре *Pericularia oryzae* накапливаются пировиноградная и α -кетоглутаровая кислоты и в особенности диметилпировиноградная кислота. Одновременно у нее тормозится накопление макроэргических фосфатов и кофакторов окислительно-восстановительных энзимов, важных для углеводного обмена (АТФ и НАД). Нуждается в биотине большой ряд грибов, особенно среди сумчатых и несовершенных, причем больше, чем у половины из них эта потребность комбинируется с потребностью в тиамине и в других факторах роста.

Для таких грибов, как *Saccharomyces cerevisiae*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys atra* и *Candida albicans*, биотин может быть заменен оксибиотином, хотя активность последнего составляет только 10—20% от активности биотина. Отличие его от биотина состоит в замене серы в кольце кислородом. Дестиобиотин, вероятно, является промежуточным продуктом при синтезе биотина. Он был обнаружен у *Penicillium chrysogenum* (Miller, 1961) и может удовлетворять потребность в биотине у мутантов *Neurospora crassa*. На *Ophiostoma pini* он действует как ингибитор обмена. Другое производное биотина, образующееся наряду с ним у *Aspergillus niger*, — биотинсульфоксид, обладает для некоторых грибов той же активностью, что и биотин (см. рис. 5.4). Кроме оксибиотина, дестиобиотина и биотинсульфоксида имеются и другие близкие к биотину и активные в отношении некоторых грибов производные. Например, биоцитин стимулирует рост *Isaria cretacea* (Tabor, Vining, 1959) и *Saccharomyces carlsbergiensis*. Ряд других соединений биотина нередко оказываются не стимуляторами, а конкурентными ингибиторами роста для отдельных видов грибов (Fries, 1965).

Биотин оказалось возможным получать с выходом от 0,5 до 3,6 мкг/мл у *Torula utilis* (Miller, 1961), но такие выходы не позволяют ставить вопрос о промышленном производстве биотина из этого источника.

Никотиновая кислота, или витамин РР (ниацин), недостаточность которой вызывает у людей заболевание пеллагрой, представляет собой производное пиридина с замещенным карбоксильной группой водородом по атому C_3 :

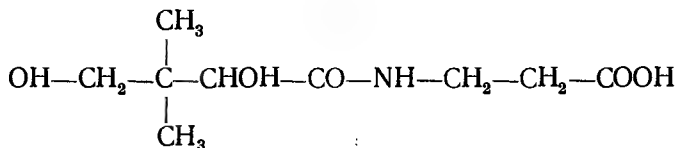


В физиологических функциях участвует не она сама, а ее амид, и эти функции очень широки, поскольку в сочетании с аденином никотинамид участвует практически во всех реакциях дегидрогенизации и гидрогенизации, т. е. окисления и восстановления через отнятие или присоединение водорода. Кроме никотинамида и аденина коферменты дегидрогеназ содержат две молекулы рибозы и две (в НАД) или три (в НАДФ) молекулы фосфорной кислоты. Восстановительные реакции осуществляются восстановленными формами этих коферментов (НАДН или НАДФН), которые одновременно могут, подобно АТФ, служить запасниками энергии. Металлическим компонентом таких дегидрогеназ чаще всего оказывается цинк. В числе дегидрогеназ, включающих цинк, находятся алкогольдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, аконитаза и ряд других. НАД-дегидрогеназы участвуют в подавляющем числе случаев в начальной ступени переноса электронов в дыхательной цепи, являясь первым акцептором водорода от окисляемого субстрата. Никотинамид участвует также в системе ферментов, восстанавливающих нитраты при образовании макроэргических фосфатов в процессе окислительного фосфорилирования.

Потребность в никотиновой кислоте среди грибов больше всего выражена у сумчатых, в особенности у дрожжей, а также у некоторых дерматофитов. Среди хитридиомицетов выявлены три вида с потребностью в витамине РР — два из рода *Blastocladia* и один из рода *Phlyctorhiza*. Из базидиомицетов нуждается в никотиновой кислоте *Pholiota aurea*, но и на среде без никотиновой кислоты она также может расти при введении в нее тиамин и даже лучше, чем при добавке одного витамина РР.

Кроме этого вида имеет потребность в витамине РР один мутант, полученный у *Polyporus abietinus* (Fries, 1965). Такие мутанты способны довольствоваться вместо никотиновой кислоты триптофаном, однако среди природных видов это наблюдалось только у одного дерматофита *Trichophyton equinum*. Из других пиримидиновых соединений обладающим стимулирующим действием в отношении роста *Fusarium solani* оказался сам пиридин, добавленный в концентрациях $0,5 \cdot 10^{-3}$ моля.

Пантотеновая кислота, или витамин B_3 , была изолирована из *Saccharomyces cerevisiae* как фактор роста дрожжей, но одновременно оказалась витамином, необходимым животным. Она представляет собой следующий комплекс:



пантотеновая, или α , γ -диокси- β ,
 β' -диметилмасляная кислота

β -аланин

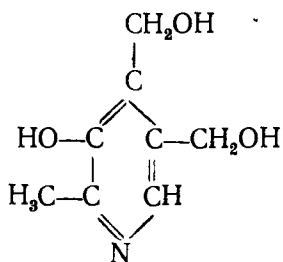
Основной функцией пантотеновой кислоты в организмах является участие ее как предшественника в биосинтезе коэнзима A_{12} .

функции которого очень многообразны, но в основном состоят в переносе двууглеродных фрагментов, преимущественно остатков ацетата, и конденсации их между собой или с каким-либо ранее образовавшимся соединением с четным числом атомов углерода. В результате этого процесса образуются новые алифатические соединения с увеличенной на два углеродных фрагмента цепью. В настоящее время известны такие включающие пантотеновую кислоту и занимающие важное место в узловых пунктах метаболизма соединения, как ацетилКоА, малонилКоА, сукцинилКоА, бутирилКоА, капронилКоА и другие. Вследствие способности участвовать в реакции конденсации КоА играет решающую роль в биосинтезе кислот цикла Кребса (лимонной, янтарной и яблочной), жирных кислот и в первых этапах обмена терпенов (синтез мевалониевой кислоты).

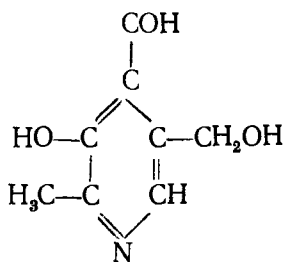
Последним этапом биосинтеза пантотеновой кислоты в клетке, видимо, является конденсация через пептидную связь пантоевой кислоты с β -аланином. Поэтому некоторые способные самостоятельно синтезировать пантоевую кислоту дрожжи, например *Schizosaccharomyces pombe*, удовлетворяются вместо полной молекулы витамина B_3 одним β -аланином. Аналогично ведет себя штамм Мейера *Saccharomyces cerevisia*. Обратное явление наблюдается у гименомицета *Polyporus texanus*, который оказывается способным синтезировать β -аланин, но нуждается в пантоевой кислоте.

Обладающих потребностью в пантотеновой кислоте видов грибов сравнительно немного. К ним относятся главным образом дрожжи из родов *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* и *Candida*. Из числа базидиомицетов нуждается в ней *Polyporus texanus*, а из семейства *Aspergillaceae* — *Penicillium digitatum*, которому наряду с этим витамином необходим также ряд других (Fries, 1965).

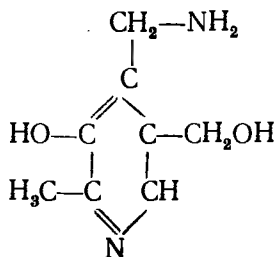
Пиридоксин, или витамин B_6 (адермин), был изолирован как витамин животных, влияющий на рост крыс. Одновременно было установлено, что он обладает стимулирующим эффектом в отношении роста микроорганизмов. Как и никотиновая кислота, пиридоксин является производным пиридина и существует в организмах в трех формах — пиридоксина (двухатомного спирта), пиридоксаля (с заменой одной спиртовой группы на альдегидную) и пиридоксамина (с замещенной аминной гидроксильной группой):



Пиридоксин



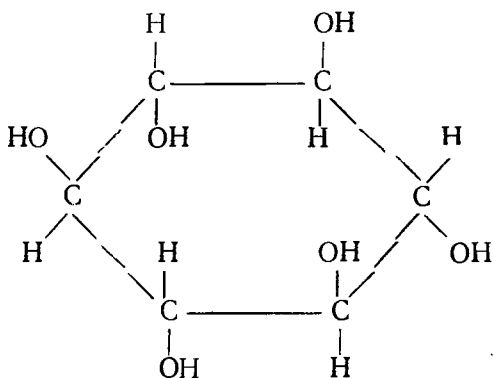
Пиридоксаль



Пиридоксамин

В большинстве ферментов он представлен в форме пиридоксаль-фосфата. Основная функция пиридоксина состоит в его участии в обмене аминокислот. Так, он принимает участие в последнем этапе восстановления нитратов при включении аммиака в α -кетокислоты, в реакциях переаминирования в трансформации триптофана в индол и участвует в биосинтезе аланина, а также, видимо, биогенных аминов грибов. Потребностью в пиридоксине обладают главным образом дрожжи и некоторые сумчатые грибы, такие как виды *Ophiostoma*, *Ascoidea rubescens*, а также *Trichophyton discoides* из числа дерматофитов. Потребность в пиридоксине, как правило, комбинируется с потребностью в других факторах роста. Из различных производных пиридоксина *Saccharomyces carlsbergiensis* и *Ophiostoma multiannulatum* лучше растет на пиридоксамине, а некоторые мутанты *O. multiannulatum* испытывают в нем специальную потребность.

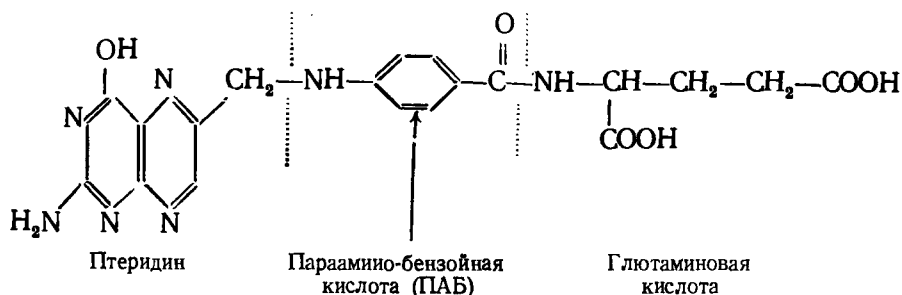
Мезоинозит (i-инозит, миоинозит или гексаоксоциклогексан). Стимулирующий эффект мезоинозита в отношении роста дрожжей был установлен еще в 1928 г. в опытах, проведенных на *Saccharomyces cerevisiae* (Eatscott, 1928). Структура его очень сходна со структурой гексоз и образуется он, видимо, в цикле пентоз.



Однако физиологическая роль его в обмене пока еще не вполне ясна. Очевидно он играет роль в окислительных процессах, локализованных в митохондриях. Фосфорилированный мезоинозит был обнаружен в составе митохондрий (Lindenmayer, 1965). О необ-

ходимости его для сохранения структуры митохондрий удалось сделать вывод на основе исследований над нуждающимися в мезоинозите видами дрожжей — *Saccharomyces carlsbergiensis* и *Kloekere apiculata*. Потребность в мезоинозите характерна для многих дрожжей и других сумчатых грибов. Чаще всего эта потребность ассоциируется с одновременной потребностью в тиамине или биотине. Обычно мезоинозита требуется заметно больше, чем других витаминов, а именно порядка 1 мкг/мл и более, что объясняется, видимо, его участием в структурных образованиях в конструкции митохондрий.

Парааминобензойная кислота представляет собой часть фолиевой, или птероилглутаминовой, кислоты — комплексного соединения, составленного из близкого по строению к пуринам птеридина, парааминобензойной и глутаминовой кислот, из которых две последние соединены между собой пептидной связью:



Потребности грибов в парааминобензойной и фолиевой кислотах нередко совпадают, так как потребность в ПАБ означает недостаточную способность к синтезу одного из компонентов фолиевой кислоты. Фолиевую кислоту обычно характеризуют как «пул фолиевой кислоты», поскольку это не одно химическое соединение, а целая группа родственных веществ: птероилглутаминовая, птероилтриглутаминовая, птероилгептаглутаминовая и другие подобные кислоты. В организмах встречаются так же как представители этого пула ризоптерин, лейковорин и биоптерин.

Основная функция, которую несет фолиевая кислота, заключается в ее участии в синтезе пуринов, в трансметилировании и в синтезе ряда аминокислот. Пул фолиевой кислоты является основным источником одноуглеродных фрагментов в таких синтезах, как формиат или метильная группа (CH₃).

Грибы обычно хорошо синтезируют фолиевую кислоту, в особенности если для этого синтеза имеется готовая парааминобензойная кислота, но и в ПАБ они нуждаются редко. Потребность в ПАБ была установлена у *Rhodotorula*, которая реагирует уже на концентрацию этого витамина в 0,03 мкг/мл, и, хотя и способна использовать вместо него фолиевую кислоту, однако в отсутствие ПАБ нуждается в ее количестве, в 10—50 раз превышающем необходимое ей количество ПАБ (Fries, 1965). В ПАБ нуждается также несколько штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, *Blastocladi*

pringsheimii, *Cortinellus berkeleanus* и несколько искусственно полученных мутантов *Neurospora*.

Биосинтезы ПАБ и никотиновой кислоты у грибов были изучены с помощью мутантов *Neurospora* и оказались связанными общими предшественниками с синтезом антриниловой кислоты, ин-

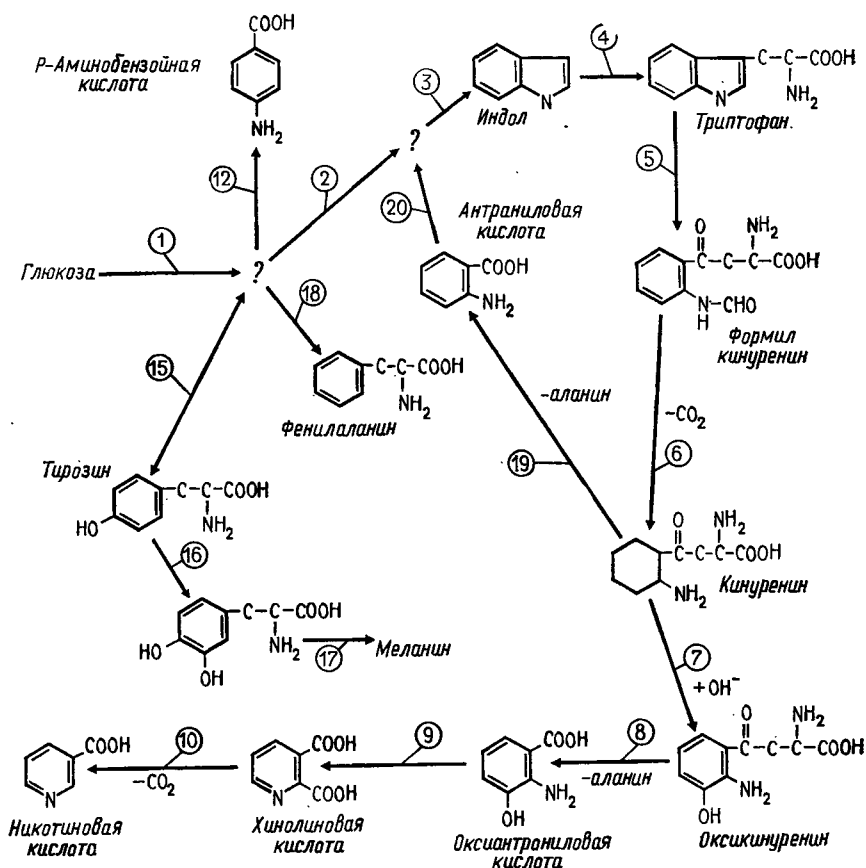


Рис. 5.5. Пути биосинтеза никотиновой и парааминобензойной кислот, построенные на основе исследований над дефицитными по этому обмену мутантами *Neurospora crassa*

дола, триптофана и ароматических аминокислот (тирозина и фенилаланина) (рис. 5.5). Сходно идет, видимо, биосинтез этих веществ у дрожжей. Так, например, полученный при действии мутагенов штамм *Hansenula anomala* может накапливать большие количества триптофана, очевидно, в силу торможения его использования далее на синтез никотиновой кислоты (Рубан, Лобырева, 1967). На синтез витаминов из группы В у дрожжей сильно влияют источники углерода. При изучении биосинтеза этих витаминов

у видов рода *Candida*, адаптированных к росту на ацетате (*C. utilis*), парафине (*C. lipolytica*) и феноле (*Candida* sp. Ф-201), оказалось, что эти дрожжи образуют большее количество некоторых витаминов на тех субстратах, к которым они адаптированы, чем на глюкозе. *C. lipolytica* образует на парафине больше тиамина и инозита, *C. utilis* на ацетате — тиамина и никотиновой кислоты и *Candida* sp. Ф-201 на феноле — больше тиамина, инозита, биотина и пиридоксина (Борукаева, 1967).

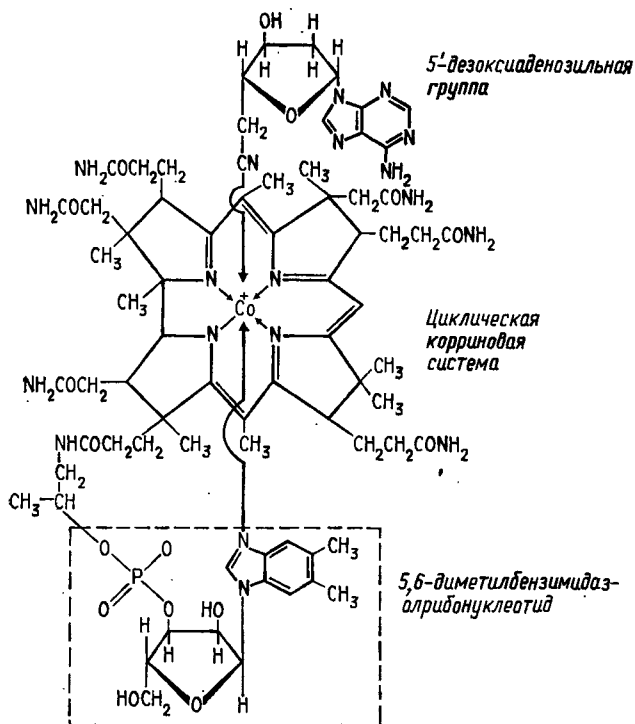


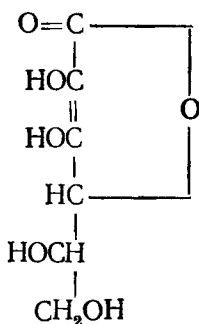
Рис. 5.6. Строение витамина B_{12} (цианкобаламина/Ленинджер, 1974)

Витамин B_{12} (цианкобаламин) состоит из 5-дезоксиаденозина в сочетании с циклической корриновой системой и бензимидазол-рибонуклеотидом (рис. 5.6) (Ленинджер, 1974). Металлическим компонентом этого витамина является кобальт. Вопрос о значении витамина B_{12} для грибов в микологической литературе до недавнего времени вообще не ставился. Считалось, что у грибов он либо отсутствует, либо имеет малое значение, поскольку у изучавшихся видов не удавалось выявить влияния на их рост входящего в состав этого витамина кобальта или самого витамина B_{12} . Сейчас установлено, что грибы образуют вещества с активностью витамина B_{12} и, следовательно, они играют роль в их обмене. Однако

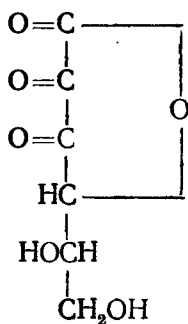
четкая зависимость роста от витамина B_{12} была найдена только у одного вида гриба, встречающегося в природе, у морского вида из *Labyrinthulales* *Thraustochytrium globosum* (Adair, Vishniac, 1958). Четыре других фактора из группы витамина B_{12} были в отношении этого вида неактивны. Активная концентрация витамина B_{12} для этого гриба оказалась очень низкой и не превышала 5 мкг/л. Частичная дефицитность в отношении синтеза витамина B_{12} была также обнаружена у *Candida albicans* (Littman, Miwatani, 1963), и в этом случае активная концентрация его приближалась к 1 мкг/мл и выше. Чувствительны к нему также и некоторые дрожжи, например *Kloekera brevis*, с помощью которой его определяют.

Из числа других соединений со сходной структурой была обнаружена потребность в гемине для роста *Pilobolus*. Эффективными в отношении этого рода грибов оказались несколько производных гемина, например копроген и феррихром. Требующиеся для этих грибов количества порфириновых соединений несколько выше, чем необходимые обычно представителям царства грибов количества витаминов, и достигают нескольких миллиграммов на литр среды.

Витамин С (аскорбиновая кислота).



L-аскорбиновая
кислота



L-дегидроаскор-
биновая кислота

Витамин С имеет структуру, сходную с кетосахарами, и функции его связаны с его способностью легко окисляться в дегидроаскорбиновую кислоту. Потребность в аскорбиновой кислоте у грибов неизвестна. Видимо, они очень хорошо синтезируют ее по ксилулозному пути углеводного обмена через промежуточные стадии глюкуроновой и гулоновой кислот. Ее можно легко обнаружить в мицелии грибов обычно используемым в гистохимии способом — реакцией с азотнокислым серебром. Такая реакция хорошо удавалась при обработке этим способом мицелия *Penicillium chrysogenum* из погруженной культуры для получения пенициллина (Беккер, 1956, 1963) или распространяющегося в ткани растения хлопчатника мицелия возбудителя фузариозного вилта *Fusarium oxysporum* (Пушкарева, Беккер, 1973).

Ростовые вещества высших растений (β -индолилуксусная кислота, или гетероауксин) различно воздействуют на рост грибов. Причем этот эффект может выражаться как в стимуляции, так и в угнетении развития грибов. Стимулирующий эффект ИУК был обнаружен у *Sclerotinia fructigena*, для которой она может заменять фактор освещения, необходимый ей для споруляции (Кнап, 1966). При культивировании ее в темноте, где конидии обычно не образуются, добавка 50 мг/л ИУК оказывается достаточной, чтобы вызвать споруляцию этого гриба. Однако при добавлении ИУК в среду освещаемой культуры интенсивность образования конидий уменьшается. Таким образом, синергизма в действии этих двух факторов не обнаружено, что говорит о различном механизме действия света и ИУК на споруляцию. Для некоторых грибов, например *Nectria galligena* и *Neurospora tetrasperma*, ИУК является угнетающим рост фактором, действие которого на них нейтрализуется защитными веществами со свойствами термостабильности. *Nectria galligena* менее способна образовывать эти защитные вещества и поэтому ингибируется более низкими концентрациями β -индолилуксусной кислоты, чем *Neurospora tetrasperma*.

Многие паразитные грибы, особенно те из них, которые вызывают аномальные разрастания тканей у поражаемых ими растений, не только не страдают от избытка ИУК, но, видимо, и сами продуцируют ее в больших количествах. Сюда относятся головневые грибы, *Taphrina* и целый ряд других. На среде с аминокислотами *Taphrina* образует много веществ со свойствами ауксинов. В присутствии фенилаланина, гистидина и триптофана она образует ИУК, в присутствии остальных аминокислот — другие ауксины. ИУК выделяется у нее также на среде с индолом и серином, хотя внесение в нее смеси моноаминокислот и подавляет этот синтез. Промежуточным продуктом синтеза ИУК, очевидно, является триптофан, также обнаруживающийся в культуральной среде *Taphrina*. Образования индола из антраниловой кислоты, которое наблюдалось у дрожжей, у этого организма не обнаружено.

3. Жирорастворимые витамины

К жирорастворимым витаминам относят витамин А и группу витамина D, а также витамины К, Е и Q. Все эти соединения относятся к продуктам обмена шунта терпенов, хотя и синтезируются на разных его этапах: А — на пути биосинтеза каротиноидов, D-стероидов, Q, К и Е — при частичной циклизации фарнезола или сквалена. Представители почти всех этих витаминов (кроме К и Е) обнаружены у грибов, и они синтезируют их настолько хорошо, что потребность в них у этих организмов, как правило, отсутствует.

Витамин А и каротиноиды. Витамин А был первым из изученных витаминов и представляет собой ровно половину молекулы β -каротина, расщепление которого по шестой из его одиннадцати двойных связей дает две молекулы витамина А (рис. 5.7).

α -Каротин дает при расщеплении только одну молекулу этого витамина, а ликопин ни одной, так как для формирования структуры витамина А необходимо присутствие циклической β -иононовой группировки, которых в α -каротине одна, а в ликопине они отсутствуют. Грибы обычно очень хорошо синтезируют каротиноиды и

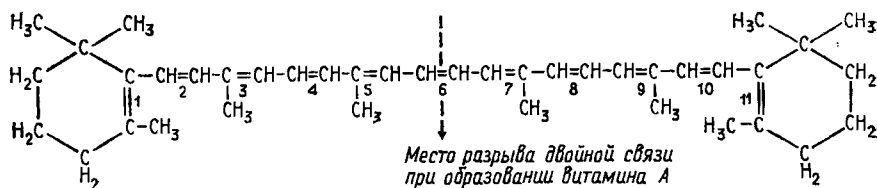


Рис. 5.7. Структура β -каротина и формирование из него витамина А

поэтому в источниках витамина А не нуждаются. Биосинтез каротиноидов у грибов широко изучался Т. Гудвином (1954, 1962), которому удалось показать его путь через конденсацию пентенилфосфата и фарнезилфосфата при инкубации этих веществ с дрожжевым экстрактом, в результате чего был получен геранилгераниол — соединение, представляющее собой половину молекулы алифатических каротиноидов типа ликопина. Предположительно, первый из формирующихся алифатических каротиноидов — фитоин — образуется путем конденсации двух молекул геранилгераниола.

Дальнейший путь их биосинтеза протекает через ступенчатое окисление (Weete, 1980) с потерей на каждой ступени двух протонов, сопровождающейся образованием новой двойной связи (рис. 5.8). При этом на третьей ступени окисления образуется нейроспорин, а на четвертой ликопин, концевые группы цепей которых претерпевают циклизацию с образованием β -зеакаротина

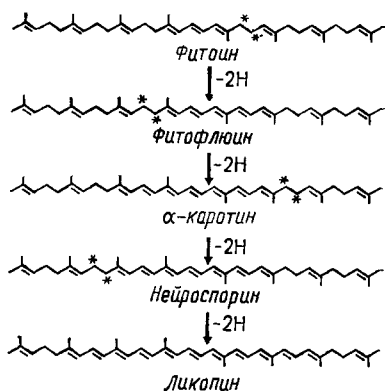


Рис. 5.8. Путь превращения фитоина в ликопин через промежуточные стадии его окисления. Звездочки указывают атомы углерода, теряющие водород на следующей стадии окисления (Weete, 1980)

(из нейроспорина) или γ -каротина (из ликопина), формирующего на конечном этапе β -каротин (рис. 5.9). Все эти виды каротиноидов были обнаружены у грибов, однако необходимо отметить, что типичной для них является широкая представленность веществ с кислой природой, подобных каротиноидному пигменту раков, астаксантину. Относительно сильно окисленные соединения — ксанто-

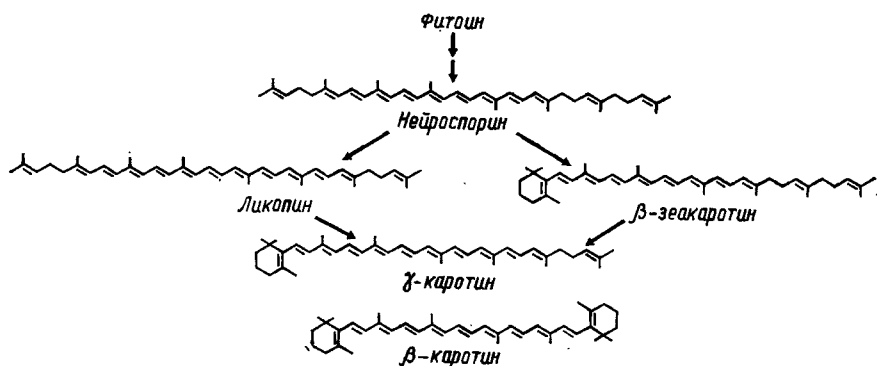


Рис. 5.9. Биосинтез β-каротина и γ-каротина у грибов из алифатических форм каротиноидов (Weete, 1980)

филлы — у грибов сравнительно редки, но сильно восстановленных и метоксилированных каротиноидов встречается много (Гудвин,

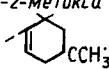
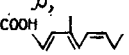
Каротиноиды	Особенности строения			Встречаемость в классах грибов
	Ионовая группа	Дополнительная группа	Число двойных связей (-C=C-)	
β-каротин		—	11	все классы
α-каротин		—	11	все классы
γ-каротин		—	12	все классы
δ-каротин		—	12	Basidiomycetes
Рубиксантин (Закси-γ-каротин)		3-окси (β-ионон)	12	Basidiomycetes (ржавчинные)
Торулин (2-метокси-γ-каротин)		2-метокси (β-ионон)	12	Ascomycetes и Basidiomycetes
Торулародин		Редуцированная цепь с карбоксильным остатком	12	Basidiomycetes (Rhodotorula, ржавчинные)

Рис. 5.10. Каротиноиды грибов с циклической структурой (Гудвин, 1954; Weete, 1980)

1954, 1962). У грибов обнаружено 7 каротиноидов с циклической структурой концевых групп и 11—12 двойными связями (рис. 5.10). Среди них особенно широко распространены β -, α - и γ -каротины и несколько реже δ -каротин (у базидиальных грибов). К той же группе относятся гидроксированные каротиноиды типа ксантофилла, как рубиксантин, встречающийся также у базидиомицетов, метоксилированный торулин и каротиноид с деградированным кольцом и карбоксильной группой, торулародин, встречающиеся у *Rhodotorula* и ряда других сумчатых и базидиальных грибов.

У грибов также встречается много каротиноидов (порядка 8) типа ликопина с алифатической структурой (рис. 5.11), отличающихся друг от друга разной степенью восстановленности или на-

Каротиноиды — производные ликопина	Особенности строения			Встречаемость
	Число двойных связей (—C=C—)	Насыщенность по сравнению с ликопином	Дополнительная группа или свойства	В классах грибов
Ликопин	13	—	—	<i>Zygomycetes</i> <i>Ascomycetes</i> <i>Basidiomycetes</i>
Нейроспорин (дигидроликопин)	12	+2H	—	<i>Zygomycetes</i> <i>Ascomycetes</i>
β -каротин (тетрагидроликопин)	11	+4H	— окрашен	<i>Zygomycetes</i>
Фитофлуин (гексагидроликопин)	10	+6H	— флуорисцирует в УФ-свете	<i>Zygomycetes</i> <i>Ascomycetes</i> <i>Basidiomycetes</i>
Фитоин (октагидроликопин)	9	+8H	— бесцветный поглощает при 220 нм	<i>Zygomycetes</i> <i>Ascomycetes</i> <i>Basidiomycetes</i>
Ликоксантин или родопин (3-оксиликопин)	13	—	3 — OH	<i>Ascomycetes</i>
Родовиолаксин (3-метоксиликопин)	13	—	3 — OCH ₃	<i>Myxomycetes</i> <i>Ascomycetes</i>
Родопурпурин	C ₄₀ H ₅₆ или H ₆₆ Точная структура неизвестна			<i>Ascomycetes</i>

Рис. 5.11. Каротиноиды грибов — производные ликопина (Гудвин, 1954; Weete, 1980)

личием гидроксильных (ликоксантин) или метоксильных (родовиоласцин) групп. Ряд соединений из этой группы составляет последовательную прогрессию, в которой каждый последующий компонент отличается от предыдущего выпадом одной двойной связи при включении в молекулу двух атомов водорода: ликопин ($11 \text{ C}=\text{C}$) $\rightarrow$ нейроспорин ($12 \text{ C}=\text{C}$) $\rightarrow$ β -каротин ($11 \text{ C}=\text{C}$) $\rightarrow$ фитофлуин ($10 \text{ C}=\text{C}$) $\rightarrow$ фитоин ($9 \text{ C}=\text{C}$). Фитофлуин и фитоин, в отличие от других каротиноидов с их желтой, оранжевой или красной окраской, бесцветны, но фитофлуин флуоресцирует в ультрафиолетовом свете, а фитоин поглощает его при длине волны около 220 нм. Все это зависит от потери обуславливающих окраску и длину волны отражаемого света двойных связей.

Количество бесцветных каротиноидов нередко в сотни раз превышает количество окрашенных, например у *Rhodotorula gracilis* (Вечер, Куликова, 1968). Все эти алифатические каротиноиды встречаются преимущественно у зигомицетов и аскомицетов, хотя некоторые из них были найдены и у базидиальных грибов (ликопин, фитофлуин, фитоин) и миксомицетов (родовиоласцин/Гудвин, 1954). Каротиноиды часто встречаются у грибов, хотя у некоторых они не найдены, а разнообразие их не меньшее, чем у высших растений. Они обильны во всех таксономических группах, только разнообразие их связано в большей мере с высшими грибами из сумчатых и базидиальных и в меньшей мере представлено у миксомицетов и хитридиомицетов. В определенных таксономических группах встречаются сходные каротиноиды. Например, у розовых дрожжей *Rhodotorula* и *Sporobolomyces* — β -каротин и торулин, а у всех видов *Rhodotorula* еще и торулородин. Всем видам рода *Allomyces* свойствен γ -каротин.

Образуют каротиноиды многие дейтеромицеты, а также сумчатые грибы и особенно базидиомицеты, которые пока изучены весьма слабо. Из зигомицетов наиболее обильно образуют каротиноиды виды родов *Phycomyces*, *Pilobolus*, *Choanephora* (*Blakeslea*) *trisporea* и другие виды *Choanephora* (Милюк, Белякова, 1969).

Поскольку каротиноиды могут служить источником чрезвычайно важного для всех организмов витамина А, большое внимание было уделено изучению условий их биосинтеза. Для образования каротиноидов обычно бывает полезен сдвиг соотношения между азотом и углеродом в среде в сторону большего преобладания углерода. Не все источники углерода одинаково хороши для этого биосинтеза. Например, для биосинтеза каротиноидов у *Sporobolomyces* рафиноза и мальтоза оказываются лучшими источниками углерода, чем глюкоза, а глицерин — лучшим, чем маннит. Образование каротиноидов у этого вида стимулировали янтарная кислота и некоторые аминокислоты, например, сходный с изопренами по структуре и числу атомов углерода валин, а также аспарагин, аргинин и глютаминовая кислота (Бобкова, 1965). Благоприятный эффект добавки 0,05% таких аминокислот, как лейцин, глицин, глютаминовая кислота и аспарагин для синтеза каротиноидов, был обнаружен также у *Choanephora trisporea* (Дедюхина, Бехтерева, 1968).

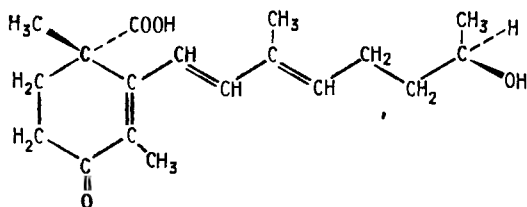
Эффект соединения	Название препарата	Структурная формула
Сильные стимуляторы	β -ионан	
	α -ионал	
	α -иран	
	иралля (α -изометиллианон)	
Слабые стимуляторы	мирценаль	
	виолон	
	α -и β -пинены	
	лимонен-дипентен	
Безразличные	циклогексан	
	циклогексанон	
	сукцинимид	
Угнетающие каротиногенез	циклональ	

Рис. 5.12. Терпеновые соединения, влияющие на каротиногенез у *Choanephora (Blakeslea) trispora* (Колот и др., 1969)

При введении в среду неорганических источников азота *Sporobolomyces* лучше синтезировал каротин на среде с азотнокислым калием, поскольку каротиногенезу способствует слабощелочная или нейтральная реакция среды. Однако на среде с сернокислым аммонием лучше поддерживался рост мицелия, вследствие чего она оказывалась в общем более благоприятной для биосинтеза каротина (Бобкова, 1965). Биосинтез каротиноидов у *Choanephora trispora* лучше всего протекает при росте на комплексных органических средах, например на смеси из гидролизатов соевой и кукурузной муки (Колот, 1969; Бехтерева и др., 1969).

Кроме сходных по структуре с изопренами аминокислот, например валина, и растительных масел, например хлопкового, в качестве стимуляторов синтеза каротиноидов в среду оказалось полезным добавлять после 48 ч роста их предшественники, сходные по структуре с β -ионом или сам β -ион в концентрациях от 0,1 до 0,5% (см. рис. 5.12).

Другим сильным стимулятором каротиногенеза, выделяемым из культуральной жидкости совместной культуры (+) и (–) штаммов *Choanephora trispora* является так называемая триспоровая кислота или фактор β (Бехтерева и др., 1969):



Структура триспоровой кислоты очень сходна со структурой β -иона, а ее дипентеновая боковая цепь примерно соответствует по числу атомов углерода половине молекулы каротина, так что она является весьма вероятным прямым предшественником β -каротина. Достигаемая ее введением в среду стимуляция каротиногенеза выражается увеличением выхода продукта в 10–20 раз, например, этот выход повышается с уровня 202 мкг на 1 г массы сухого мицелия до 5200 мкг/г.

По многим данным, синтез окрашенных каротиноидов стимулируется светом. В частности, это известно для продуцирующего β -каротин *Penicillium sclerotiorum*. При этом в основном эффективны лучи с длиной волн от 400 до 500 нм, являющиеся областью поглощения β -каротина. Бесцветные каротиноиды, видимо, образуются без участия света (Колот, 1969). Этот спектр действия оказался также сходным со спектром фототропизма спорангиеносцев *Rhizomyces* и колеоптилей овса, что, возможно, говорит о взаимосвязи механизма этих фототропических реакций и биосинтеза каротина (Rau, 1967). Непрерывное освещение мощностью в 1076 люкс увеличивало синтез каротиноидов у гриба *Syzygites*

megalocarpus, который образовывал β - и γ -каротины и ликопин (Wenger, Lilly, 1966).

β -Каротин получали до последнего времени для медицинских целей из моркови. Ввиду сезонности, относительной дороговизны этого сырья для животноводческих целей и большой потребности в них в этой отрасли хозяйства проводятся многочисленные изыскания с целью получения каротиноидов микробиологическим методом. Для этого пытаются использовать розовые дрожжи из рода *Rhodotorula*, например *Rhodotorula gracilis* (Вечер, Куликова, 1968). Однако этот вид образует много каротиноидов, не могущих служить источником витамина А, как например торулордин, торулин и другие, но может одновременно служить кормовым белком. Последовательность накопления отдельных каротиноидов позволяет выяснить путь их биосинтеза, который, очевидно, достигает максимума после наибольшего накопления биомассы и складывается из последовательности: β -каротин $\rightarrow$ торулин $\rightarrow$ торулордин. Неясной остается только роль фитина, образующегося в количестве, в 10—20 раз большем, чем другие каротиноиды.

Кроме этих организмов был обнаружен еще один перспективный продуцент каротиноидов — базидиомицет *Dacrymyces deliquescentis* из группы фрагмобазидиомицетов. Этот гриб оказался хорошо растущим на солодовом и картофельно-декстрозном агаре, а также и на древесине.

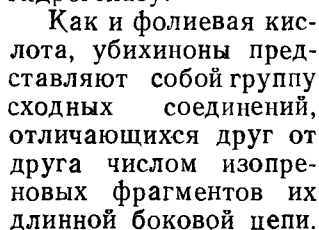
Были сделаны также попытки использовать для биосинтеза каротиноидов *Penicillium sclerotiorum*, *Choanephora persicaria*, *C. curvitarum* и виды *Neurospora*.

О значении каротиноидов для грибов существует очень много разнообразных мнений, что, вероятно, связано с реальным разнообразием их функций. Иногда считают, что они принимают участие в окислительно-восстановительных процессах в клетке и поэтому связаны с митохондриями. Из этого вытекает другая приписываемая им роль экранов, защищающих клетку от избыточного окисления. При культивировании грибных организмов в условиях усиленной аэрации или на средах с дефицитом азота, где окисление идет интенсивно, они синтезируются в большом количестве.

Им также приписывалась роль половых гормонов, так как известно, что их синтез нередко связан с гаметообразованием и что у гамет одного пола они накапливаются более интенсивно, чем у другого. У муковых грибов их больше у женского (+) мицелия, а в гаметах *Allomyces javanicus*, наоборот, в подвижных мужских гаметах. Кроме этих функций они участвуют у грибов в фототропических изгибах спорангиеносцев у муковых, сумок у аскомицетов и плодовых тел ряда высших грибов. Мевус приписывал роль определяющего пол гормона бесцветному каротиноиду кроцетину, синтезируемому хламидомонадами. Для грибов таких сведений пока не имеется.

Хиноны, производные терпенового обмена. Из других веществ, близких по строению к каротиноидам, предположительно включающихся как кофакторы в состав ферментов дыхательной цепи,

яснено, что в процессе бактериального фотосинтеза он является передатчиком энергии фотонов с бактериохлорофилла на НАД-дегидрогеназу.



Среди грибов эти соединения были найдены у дрожжей, в числе которых у *Saccharomyces cerevisiae* был найден убихинон Q₆ с 6 изопреновыми фрагментами в боковой цепи, а у *Torula* Q₇ и Q₉.

Из дальнейших близких к убихинону витаминов, играющих роль в дыхательной цепи, известны токоферол (витамин Е/см. рис. 5.13) и витамин К, но относительно наличия их у грибов или потребности в них пока сведений не имеется. Витамин К₂, содержащий в боковой цепи дифарнезол, был обнаружен только у бактерий (Девис и др., 1966).

Относительно своеобразия состава и путей биосинтеза стеролов грибов, относящихся преимущественно к группе эргостерина, уже

упоминалось выше, как и о том, что основная доля их общего количества составлена провитамином D, эргостерином, из которого при облучении его ультрафиолетовым светом можно получить этот витамин в его активной форме кальциферола. Примером количественного уровня в грибах эргостерина может служить результат его анализа в мицелии *Penicillium chrysogenum*, полученном после ферментации пенициллина, в котором его обнаруживали в количестве до 1,1% от массы сухого мицелия. В связи с этим отходы мицелия после ферментации пенициллина одно время служили для получения витамина D и приготовления лечебного драже. В настоящее время витамин D получают для медицинских целей чаще из пекарских дрожжей. Синтез стероидов, которые у грибов, как и каротиноиды, по их локализации в клетке связаны с жирами, обычно не нуждается в предшественниках и идет весьма интенсивно.

Единственная известная у грибов потребность в стеролах обнаружена у некоторых переномицетов (Gomez-Miranda, Leal, 1965) и у растущих анаэробно дрожжей, которые нуждаются при этом в эргостерине (Fries, 1965). У ряда грибов, в частности у видов *Fusarium* из секции *Sporotrichiella*, у *Stachybotrys alternans*, *Fusella olivacea* и некоторых других найдена обильная продукция стероидов (или циклических производных фарнезола) в форме водно-растворимых сапонинов с остатками олигосахаридов, обладающих токсическим эффектом в отношении кроветворной деятельности человека и животных (алиментарно токсическая алейкия) или роста трубчатых костей (уровская болезнь/Олифсон, 1957). Олифсон приписывает им структуру циклопентанфенантронов. Вероятное экологическое значение этих веществ для грибов связано с явлениями проницаемости (Беккер, 1975).

В последнее время стали появляться сведения о важном физиологическом значении для грибов еще нескольких видов стероидов. К ним относятся β -ситостерол, стигмастерол, эргостерин и холестерин, которые оказались играющими важную роль в размножении некоторых оомицетов. К числу последних относятся виды *Phytophthora* и *Pythium*. Оказалось, что эти стероиды стимулируют у них образование зооспорангиев и органов полового плодоношения (Пыстина, 1973).

Питание и обмен веществ у живых организмов были бы невозможны без специфических органических катализаторов — ферментов, и в особенности это касается организмов гетеротрофов, которые используют для своего питания сложные органические соединения, находящиеся в окружающей их среде. Эти органические соединения очень часто, если не в большинстве случаев, представляют собой нерастворимые в воде полимеры, которые необходимо при их использовании расщепить на отдельные молекулы — мономеры. Для этого требуется широко развитая способность выделять в окружающую среду экзоферменты, приспособленные к находящемуся в ней субстрату. Другими словами, гетеротрофным организмам необходимо обладать способностью изменять в зависимости от условий среды качественный и количественный состав синтезируемого ими комплекса ферментов.

Ферменты не распределены равномерно по всей клетке, а в большинстве случаев связаны с определенными ее структурами. Это показали уже самые первые опыты по суперцентрифугированию клеточных гомогенатов. При этом нижний слой гомогената, содержащий митохондрии, показал в аппарате Варбурга поглощение кислорода, измеряемое 2500 условными единицами, средний слой, содержащий рибосомы — 60 единицами, а у не содержащего субклеточных структур верхнего слоя поглощение кислорода отсутствовало полностью. Такой прозрачный цитоплазматический слой обычно содержит только гидролитические ферменты и большую часть ферментов путей гликолиза, тогда как ферменты цикла Кребса, дыхательной цепи и большинство синтетаз содержатся в митохондриях, микросомах, рибосомах, мембранах и в ядрах клеток. Гидролитических ферментов может оказаться больше, чем в клетке, в окружающей среде, куда они интенсивно выделяются.

Однако чаще это происходит не сразу после их биосинтеза, сопровождающего рост продуцента. Первоначально они накапливаются в мицелии, как связанные в цитоплазматической мембране. Участвующие в их биосинтезе связки рибосом и соответствующая информационная РНК локализуются на внутренней стороне плазматической мембраны (рис. 6.1). Формируемый ими фермент локализуется внутри нее и представляет собой в это время высокомолекулярный фосфолипопротейн, содержащий одновременно липофильную и гидрофильную с терминальной NH_2 -группой цепи, способствующие ее транспортировке через мембрану. Окончательно сформированный энзим попадает далее в периплазматические пузырьки — мезосомы, причем его молекулярная масса падает в ~ 20 раз, видимо, за счет потери транспортных устройств, отщеп-

ляемых эндопептидазами. Энзим принимает при этом форму энзиматически активного глобулярного белка и транспортируется на наружную поверхность мембраны и в окружающую среду (Borris, 1981).

Сложный процесс синтеза и транспорта таких энзимов, естественно, разобщает во времени сопровождающий рост общий биосинтез белков и выделение и накопление гидролаз в культуральной среде. Именно с этим связано наблюдаемое у грибов резкое различие в длительности жизни информационной РНК, кодирующей биосинтез секреторных гидролаз, по сравнению с кодирующей внутриклеточные энзимы, что, вероятно, зависит от течения формирования секреторных энзимов в мембрано-связанном состоянии.

Связанное с полимерами мембран состояние способствует сохранности стабильности не только кодирующей синтез ферментов информационной РНК, но и самих энзимов, что в последнее время широко используется для их стабилизации.

Среди ферментов различают конститутивные, формирующиеся с самого начала онтогенеза, и адаптивные, появляющиеся впоследствии в зависимости от условий окружающей среды. В случае гидролитических адаптивных ферментов, расщепляющих высокомолекулярные субстраты (полисахариды, белки и т. п.), индукторами их появления могут быть либо их субстраты, либо иногда мономерные продукты производимых ими реакций. Последнее отмечалось для некоторых ферментов, гидролизующих полисахариды, например, индуктором некоторых пектиназ является галактуроновая кислота. Субстрат реакции нередко индуцирует также формирование ферментов, участвующих в детоксикации. Так, принадлежащий к эстеразам фермент трихотециназа начинает образовываться у почвенных грибов при наличии в среде субтоксических доз антибиотика трихотецина.

Даже конститутивные энзимы, к которым относится большинство ферментов основного обмена, в онтогенезе грибов формируются не сразу, а в определенной последовательности, и кроме того, набор их в зависимости от возраста культуры сильно меняется как

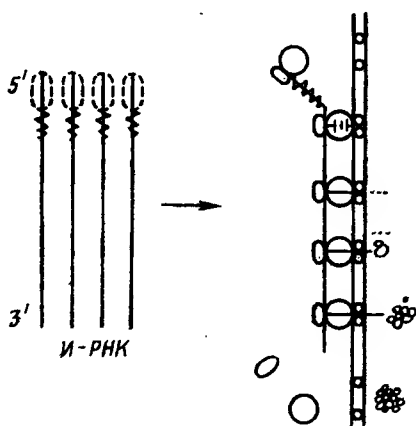


Рис. 6.1. Гипотетическая модель синтеза и секреции экзонзима. Сигнальный кодон информационной РНК обозначен как область зигзага, сигнальная последовательность в начале нативного протеина — как пунктирная линия. Направо — изменение конформации и выделение через клеточную мембрану в среду синтезированного энзима (Borris, 1981)

по количественным соотношениям, так и качественно. Это можно видеть из целого ряда примеров, часть из которых уже приводилась при обсуждении путей гликолиза у грибов. Было установлено, что изменения в наборе дыхательных энзимов, включающих гексокиназу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, дегидрогеназы кислот цикла Кребса и ряд других, и в их активности наблюдаются уже при прорастании спор ряда плесневых грибов, как *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium atroviridatum*, *P. oxalicum*. В процессе образования ростовых трубок активность ряда ферментов, особенно имеющих в качестве кофермента НАД, возрастала в 51—200 раз.

Аналогичная картина наблюдалась при развитии у грибов органов плодоношения. При развитии шляпки плодовых тел *Schizophyllum commune* в ней значительно возрастала активность R-глюканазы, расщепляющей содержащийся в оболочках его клеток полисахарид с одной-тремя связями мономеров глюкозы, R-глюкан. Особенно активизировался этот адаптивный энзим при недостатке в среде глюкозы (Wessels, 1966). Активность многих ферментов меняется не только на протяжении всего онтогенеза или его узловых этапов, но и при таких краткосрочных периодических процессах, как деление клеточных ядер. Так, у базидиомицета *Clavatia cyathiformis* в гифах, находящихся в состоянии мейоза (редукционного деления), резко возрастала активность фосфатазы (Blumer, Li-Yu-Ten, 1966). Сильно изменялось также содержание окислительных и других ферментов в процессе развития мицелия *Penicillium chrysogenum* при ферментации пенициллина (Маттисон, 1956) и концентрация амилазы в погруженной культуре *Aspergillus niger*. Примеры подобного рода могут быть значительно расширены.

1. Ферменты фосфорного обмена

Ферменты фосфорного обмена представляют собой особенно важную категорию катализаторов обмена веществ, поскольку они обеспечивают формирование и передачу запасов энергии в форме макроэргических фосфорных связей почти для всех процессов биологического синтеза в клетке, являясь агентами запасаания энергии для этих синтезов, источником которой служит окислительное фосфорилирование. Ферменты, участвующие в этом метаболизме, очень разнородны по их химическому действию, так как их можно причислять к категориям трансфераз, оксидоредуктаз и эстераз.

Для понимания способа действия и назначения этих ферментов полезно рассмотреть принцип работы механизмов образования и использования энергии макроэргических фосфорных связей ($—O—P—O—P—O—$). Образованию таких связей, как правило, предшествует получение энергии за счет окисления, которое осуществляется один (в цикле ЭМП) или два раза (в цикле ГМФ) в гликолитическом шунте и не менее четырех раз в цикле трикарбоновых кислот. В процессе гликолиза для окислительного фосфорилирования используется энергия, получаемая при окислении

3-фосфоглицеринового альдегида в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту, макроэргический фосфат которой переносится затем, при трансформации ее в 3-фосфоглицериновую кислоту, на АДФ, трансформирующийся при этом в АТФ (рис. 6.2). Аналогичный процесс протекает в пределах цикла трикарбоновых кислот, например, при образовании сукцинил коэнзима А и трансформации его в янтарную кислоту (рис. 6.3).

Помимо ферментов, относящихся к НАД и флавиндегидрогеназам, обеспечивающих этап получения энергии путем окисления, в этих процессах принимают участие энзимы, переносящие неорганический фосфат (ацилирующие), осуществляющие дальнейшее перемещение фосфата на АДФ, киназы, фосфотрансферазы, переносящие фосфорные группы с одного углевода на другой или с одного атома углерода на другой. В этапе использования энергии фосфорных связей на синтезы участвуют фосфатазы, отщепляющие неорганический ортофосфат или пиррофосфат, а субстратом для этого процесса могут служить как нуклеотиды (например, АТФ), так и обильные у грибов полифосфаты (см. вторую главу).

Как при использовании донора энергии АТФ, так и полифосфатов, запасание и расходование энергии фосфорных связей распадается на два этапа: образование этих связей и их расщепление. Первый этап осуществляется с помощью ацилирующих энзимов, содержащих SH-группы (в частности, в форме КоА). В качестве кофермента фосфогексокиназы, переносящей фосфор при фосфорилировании моносахаров, известен рибофлавин. Вто-

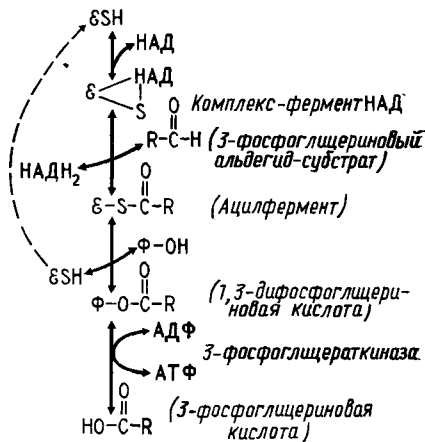


Рис. 6.2. Механизм фосфорилирования, сопряженный с окислением фосфоглицеринового альдегида в 1,3-фосфоглицериновую кислоту: Е — энзим (дегидрогеназа); Ф — фосфат (Девис и др., 1966)

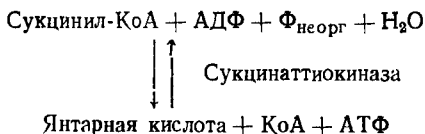


Рис. 6.3. Фосфорилирование АДФ в цикле Кребса (Девис и др., 1966)

рой этап — расщепление фосфорных связей с образованием ортофосфата — осуществляется фосфатазами, которые в связи с их использованием для аналитических целей изучались довольно подробно.

Эти ферменты применяются, в частности, для отщепления фосфата от тиаминпирофосфата при анализе тиаминна и расщеплении фосфорилированного НАД при анализе витамина РР. Фосфатазы относятся к эстеразам, гидролизующим эфиры фосфорной кислоты. Сюда относят ферменты, гидролизующие эфиры фосфорной кислоты с углеводами, глицерофосфатазу, апиразу, расщепляющую АТФ, пирофосфатазу, метафосфатазу и другие полифосфатазы. У грибов полифосфатаза впервые была найдена Манном у *Aspergillus niger*.

В дальнейшем, при изучении этого типа энзимов у *Penicillium chrysogenum*, были найдены апираза, расщепляющая АТФ, пирофосфатаза и метафосфатаза, которые все подавлялись ионами кальция, цинка и магния при рН от 3,0 до 5,0, а также фторидами и азидом. Глицерофосфатаза *P. chrysogenum* изучалась Садасиваном, который обнаружил, что их имеется две (Sadasivan, 1965): щелочная с оптимальным рН от 8,0 до 9,0, содержащая магний и цинк, и кислая с оптимальным действием в кислом диапазоне рН. Щелочная фосфатаза сильно угнеталась синильной кислотой и кальцием и реактивировалась магнием и цинком, кислая реагировала на синильную кислоту значительно слабее.

У некоторых плесневых грибов, а именно у *Penicillium lilacinum*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger* и *Rhizoctonia violacea*, фосфатаза образовывалась и даже стимулировалась при недостатке магния в среде. Однако при введении в среду возможного конкурента магния — бериллия — у испытанных видов рода *Aspergillus* наблюдалось подавление синтеза этого фермента, хотя у других двух видов — *P. lilacinum* и *R. violacea* — на первых стадиях развития его активность усиливалась.

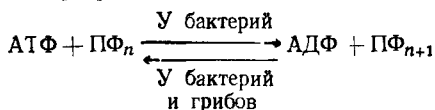
Фосфатазы проявляют высокую активность в процессе деления клеток, что было отмечено как для процессов редукционного деления на примере базидиомицета *Clavatia cyatiformis* (Blumer, Li-Yu-Ten, 1966), так и для обычного карิโอкинеза у целого ряда паразитных и сапротрофных грибов.

При рассмотрении фосфорного обмена у высших эукариот, растений и животных основное внимание уделяется реакциям, в которых принимает участие как донор фосфора и энергии аденозинтрифосфат. Однако низшие эукариоты (грибы, водоросли, протисты) и прокариоты (бактерии, актиномицеты и цианобактерии) имеют и другие, видимо, еще более значимые для их метаболизма, чем АТФ, доноры фосфора и энергии, а именно пирофосфат и неорганические высокополимерные полифосфаты. Поэтому ферменты грибов, имеющие отношение к их обмену, заслуживают специального рассмотрения (Кулаев, 1975).

Такие ферменты делятся на две категории: 1) имеющие отношение к их биосинтезу и 2) функционирующие при их использовании на нужды обмена веществ. Известны два фермента, производящие наращивание цепи полифосфатов на один фрагмент, а именно полифосфаткиназа и 1,3-дифосфоглицерат-полифосфат-трансфераза (ДФГК/рис. 6.4). Полифосфаткиназа наращивает по-

лифосфатную цепь на один фрагмент за счет трансформации АТФ в АДФ. Однако направление действия полифосфаткиназы в сторону синтеза полифосфата известно только у бактерий, тогда как грибы (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*) способны только к необратимой реакции переброса фосфорной группы с полифосфата на АДФ, т. е. насыщению фосфором пула АДФ→АТФ. У ряда грибов (*Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*) не было обнаружено даже в этой реакции. Напротив, у всех иссле-

1. Полифосфаткиназа:



2. 1,3-дифосфоглицерат-полифосфаттрансфераза (ДФГ-ПФТ):

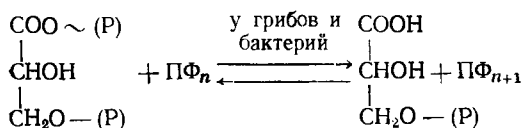


Рис. 6.4. Реакции полифосфат-синтезирующих ферментов у бактерий и грибов (Кулаев, 1975)

дованных бактерий она существовала и была обратимой, хотя и здесь, судя по максимальному развитию этой активности в конце онтогенеза бактерий, его основная роль приурочена к моменту максимального расхода полифосфатов и обогащения пула АТФ (Кулаев, 1975).

Второй фермент, 1,3-дифосфоглицератполифосфаттрансфераза (ДФГ-ПФК), наращивающий полифосфатную цепь за счет переноса фосфата с 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, был найден первоначально у аденин-дефицитного мутанта *Neurospora crassa*, но затем и у дикого штамма этого гриба, у *Penicillium chrysogenum* и у ряда бактерий и актиномицетов. При наличии альдолазы субстратом действия этого фермента может служить также и 1,6-фруктозодифосфат. Он ингибируется известными ингибиторами гликолиза по пути ЭМП как моноидуксусная кислота или смесь фторида и арсенита, что говорит о тесной связи этого пути биосинтеза полифосфатов с циклом ЭМП. О том же говорят данные цитохимических исследований онтогенеза грибов, подтверждающие связь у них синтеза полифосфатов с этим путем обмена (Дмитриева, Беккер и др., 1962). Судя по максимальной активности этого фермента в период наиболее интенсивного наращивания пула полифосфатов, именно он, а не полифосфаткиназа является наиболее вероятным агентом биосинтеза полифосфатов.

На основе первых изотопных исследований предположили, что различные фракции полифосфатов образуются за счет деградации полифосфатдеполимеразами первично синтезированных наиболее

высокомолекулярных фракций, что, в общем, соответствует истине, хотя, возможно, объясняется локализацией этих деполимераз в зоне действия синтезирующих полифосфаты ферментов в области клеточной мембраны и зоны поступления из среды ортофосфата. Однако позднее было обнаружено, что эти фракции могут синтезироваться и независимо друг от друга. Например, у базидиомцета *Lentinus tigrinus* и аскомицета *Neurospora crassa* была обнаружена корреляция накопления солерастворимой фракции полифосфатов (ПФ₂) с биосинтезом РНК и ДНК на уровне коэффициента корреляции, равном 0,88. Подтверждение объяснения этого явления было получено при исследовании на *Schizosaccharomyces pombe*.

Максимум активности предположительно участвующей в снабжении энергией биосинтеза полифосфатов пирофосфатазы опережает максимум накопления нуклеиновых кислот и ПФ₂ фракции

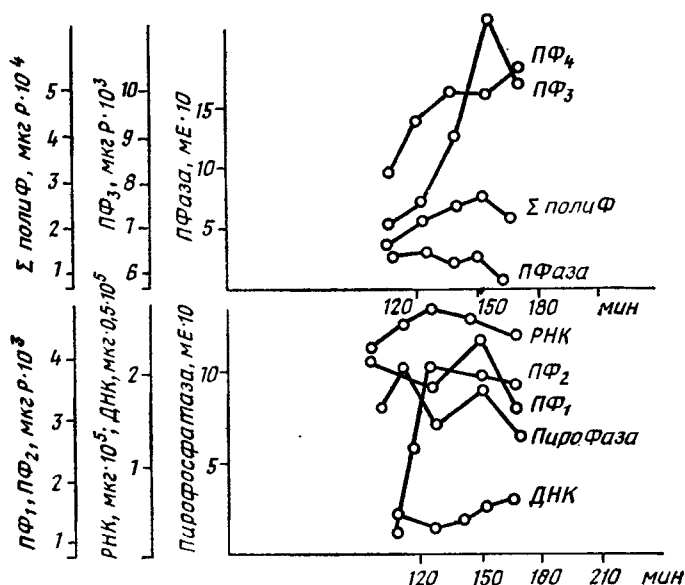


Рис. 6.5. Динамика изменения содержания нуклеиновых кислот, полифосфатов, полифосфатфосфогидролазы (ПФаз) и пирофосфатазы (ПироФаз) у *Schizosaccharomyces pombe*. ПФ₁ и ПФ₂ — кислоторастворимые и солерастворимые полифосфаты; ПФ₃, ПФ₄ и ΣПолиФ — щелочерастворимые, растворимые в горячей хлорной кислоте и сумма всех полифосфатов (Кулаев, 1975)

(рис. 6.5). Предположительная схема этого процесса приводится на рис. 6.6.

Сходный механизм с участием той же пирофосфатазы предположительно объясняет корреляцию накопления фракции полифосфатов ПФ₃ с синтезом маннана, компонента оболочки дрожжей *Saccharomyces carlsbergiensis* (рис. 6.7).

Необходимы ли для синтеза полифосфатов какие-либо матричные основы или затравки пока неясно, но есть данные, что для него требуются затравки в форме три-, тетра- и других полифосфатов. Существенно, что вторичный синтез полифосфатов действи-

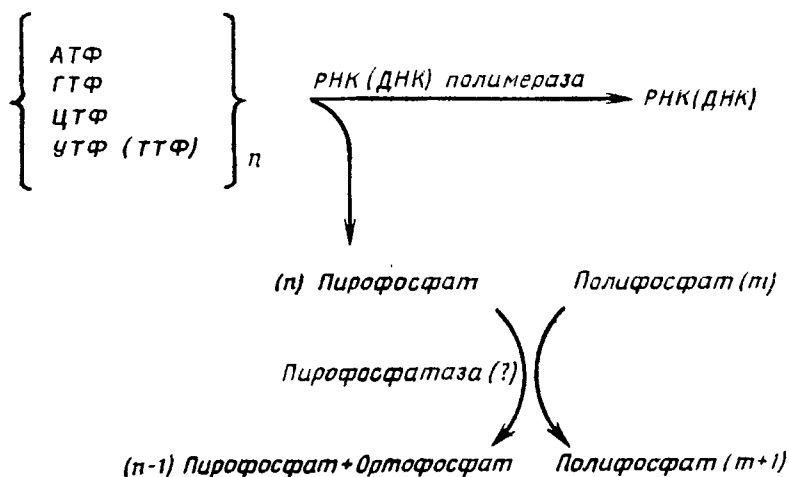


Рис. 6.6. Схема сопряженного синтеза полифосфатов и биосинтеза РНК и ДНК (Кулаев, 1975)

тельно имеет место у грибов, локализуясь в местах усиленного биосинтеза (клеточная мембрана, ядро) с использованием энергии и ортофосфата от расщепления освобождающегося при этих биосинтезах пирофосфата.

Низкополимерные пирофосфаты могут образовываться путем следующих реакций, характер которых показан в табл. 6.1. При этом триполифосфаты могут быть продуктом действия деполимераз, синтезироваться из пирофосфата и фрагмента фосфорной кислоты, отщепляемого от АТФ, быть продуктом отщепления трехфрагментного остатка фосфатов от нуклеозид трифосфата, получаться при образовании из АТФ и метионина S-аденозилметионина и, наконец, образовываться в процессе биосинтеза витамина В₁₂. Для биосинтеза тетраполифосфата (см. табл. 6.1) известна реакция, основанная на разрыве циклической структуры

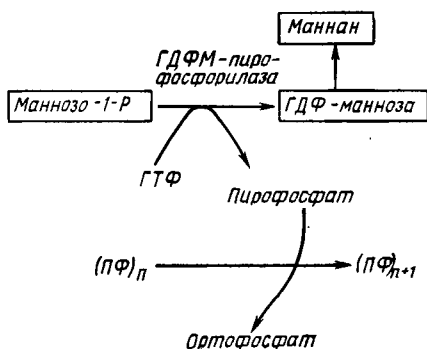


Рис. 6.7. Схема, объясняющая корреляцию накопления полифосфатов у *Saccharomyces carlsbergiensis* (Кулаев, 1975)

Способы образования триполифосфатов и тетраполифосфатов (Кулаев, 1975)

Образование триполифосфатов:

1. $\text{ПФ}_n \longrightarrow 3\text{-ПФ} + \text{ПФ}_{n-3}$.
2. $\text{Пирофосфат} + \text{АТФ} \longrightarrow 3\text{-ПФ} + \text{АДФ}$.
3. $\text{Нуклеозидпирофосфат} \longrightarrow \text{нуклеозид} + 3\text{-ПФ}$.
4. $\text{АТФ} + \text{метионин} \xrightarrow{\text{восстановленный флаavin}} \text{S-аденозилметионин} + 3\text{-ПФ}$.
5. $\text{АТФ} + \text{цианкобаламин} \xrightarrow{\text{восстановленный флаavin}} \text{5-дезоксиаденозилкобаламин} + \text{CN}^- + 3\text{-ПФ}$.

Образование тетраполифосфата:

Триметафосфат (циклический) + ортофосфат $\longrightarrow 4\text{-ПФ}$.

триметафосфата с включением в полученную цепь одного фрагмента ортофосфата (Кулаев, 1975). Реакция трансформации циклического полифосфата в линейный была обнаружена у дрожжей.

Таким образом, значительную роль в биосинтезе полифосфатов играет пирофосфат, образование которого у грибов может быть результатом не только процессов биосинтеза нуклеиновых кислот или полисахаридов, но и еще ряда реакций (табл. 6.2). Суммар-

Таблица 6.2

Пути образования пирофосфата у грибов (Кулаев, 1975)

Суммарная реакция:

$$\text{Пирофосфорил-A} + \text{B} \longrightarrow \text{A-B} + \text{пирофосфат}$$

1. Нуклеотидилтрансферазы:

$$\text{Нуклеозид-TФ} + \text{X} \longrightarrow \text{нуклеозид-MФX} + \text{пирофосфат}$$

(где X = аминокислота, жирная кислота или моносахарид и т. п.).

2. Фосфорибозилтрансферазы:

$$\text{5'-фосфорибозилпирофосфат} + \text{Y} \longrightarrow \text{Y-рибозил-5'-фосфат} + \text{пирофосфат}$$

(где Y = азотистое основание).

ная реакция состоит в сочетании между собой соединений А и В с потерей первым из них пирофосфата, отщепление которого сопровождается выделением энергии, необходимой для этой реакции. К производящим подобные реакции ферментам относятся нуклеотидилтрансферазы, ацилирующие нуклеозидтрифосфаты с образованием нуклеозидмонофосфатов аминокислот, сахаров или фрагментов жирных кислот, и фосфорибозилтрансферазы, переносящие 5'-фосфорибозильную группу на различные азотистые основания.

Кроме того, у дрожжей описана третья реакция, также дающая в качестве конечного продукта пирофосфат и состоящая в отщеплении фосфорной группы от высокомолекулярного полифосфата,

конденсирующей далее с одной молекулой ортофосфата. Однако дальнейшая проверка наличия производящего такую реакцию фермента у *Saccharomyces cerevisiae*, *Endomyces magnusii* и *Neurospora crassa* не позволила подтвердить его существование.

Поскольку полифосфаты у грибов являются специализированными донорами фосфора и энергии для биосинтеза различных клеточных структур, в их обмене помимо синтезирующих имеют значение ферменты, производящие их деградацию и гидролиз. Уже упоминалось о роли в этих процессах полифосфаткиназы бактерий, переносящей фосфорную группу с АТФ на полифосфаты при их синтезе и обратно с полифосфатов на АДФ при их использовании. Первая реакция свойственна только бактериям, тогда как вторая обнаруживается также и у некоторых грибов.

На ферментах этого типа наиболее ярко обнаруживаются особенности биохимической эволюции грибов и прокариот (бактерий и актиномицетов), подтверждающие мнение о различном их происхождении и экологической конвергентности их морфологических признаков, например сходства спораношений грибов и актиномицетов. Так, помимо различно ведущей себя у грибов и бактерий полифосфаткиназы у бактерий и актиномицетов обнаружен отсутствующий у всех испытанных представителей грибов из классов сумчатых, базидиальных, дейтеромицетов и зигомицетов фермент полифосфатглюкокиназа, фосфорилирующий глюкозу за счет отщепления концевой фрагмента полифосфатов. Этот фермент имеет узкое значение даже для прокариот, так как обнаруживается только у их представителей, относимых Красильниковым к классу актиномицетов (актиномицеты, микобактерии, коринебактерии, пропионобактерии, микрококки и т. д.), что может говорить в пользу их самостоятельной филогении, происходящей от иного корня, чем у *Eubacteria*. То же относится и к таким переносящим фосфат ферментам, как полифосфатфруктокиназа, полифосфатманнокиназа и полифосфатглюконаткиназа, которые также встречаются только у бактерий (Кулаев, 1975).

У грибов, видимо, широко развита дифференцированная в отношении разных фракций полифосфатов система полифосфатаз, сре-

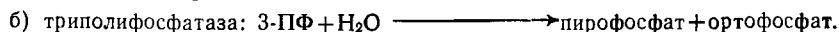
Т а б л и ц а 6.3

Ферменты грибов и бактерий, расщепляющие полифосфаты
(1 — полифосфатазы с оптимумом pH 7,1—7,5 / Кулаев, 1975)

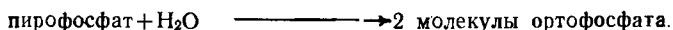
1. Полифосфатазы (полифосфатфосфогидролазы):



2. Олигополифосфатазы:



в) пирофосфатаза (бактерии и грибы):



ди которых различают категорию полифосфатфосфогидролаз, экзoферментов, гидролизующих с отщеплением конечного остатка фосфорной кислоты с образованием ортофосфата и имеющих оптимум рН в нейтральной зоне (рН 7,1–7,5, табл. 6.3).

К этой категории относятся:

- 1) полифосфатазы, гидролизующие высокомолекулярные пирофосфаты; 2) олигополифосфатазы, гидролизующие тетра-, триполифосфаты и пирофосфат. Ферменты этого типа, обнаруженные кроме бактерий у *Saccharomyces cerevisiae*, *Endomyces magnusii* и *Neurospora crassa*, обычно встречаются в форме комплекса. Так, среди комплекса ферментов этого типа у *N. crassa* выявляются одновременно присутствие полифосфатазы, триполифосфатазы, пирофосфатазы и АТФ-азы. Ферменты этой группы являются металлоферментами, стимулируемыми или

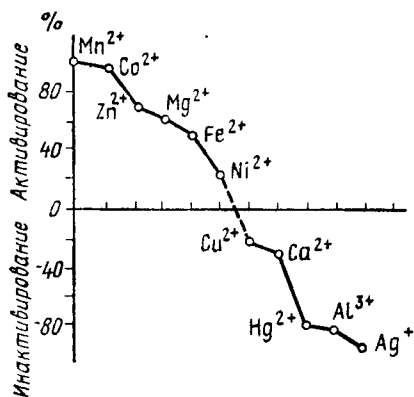


Рис. 6.8. Влияние катионов на активность полифосфатфосфогидролазы *Endomyces magnusii* (Кулаев, 1975)

ингибируемыми двухвалентными катионами металлов, как это можно видеть на примере полифосфатгидролазы *E. magnusii* на рис. 6.8. Однако действие катионов на активность этих ферментов у разных грибов оказывается различным. Так, фермент из *N. crassa* активируют магний, кобальт, марганец и железо, тогда как для фермента из *E. magnusii* наиболее эффективны марганец и кобальт, а у дрожжей к магнию и кобальту добавляется никель, сильно угнетающий фермент *N. crassa*. Подобная разнохарактерность действия катионов наблюдается и при рассмотрении их ингибирующего влияния. Вероятно, вся эта пестрота эффектов зависит от катионов, действующих как на сам фермент, так и на субстраты реакции, с которыми они образуют комплексы, способствующие облегчению или угнетению степени аттакуемости связи —O—P—O—P— .

Полифосфатазы грибов, как видно из табл. 6.4, локализируются в основном на поверхности клетки, близ локализации высокополи-

Таблица 6.4

Удельная активность полифосфатазы в клетках и их органеллах (Кулаев, 1975)

Структуры	Полифосфатаза, мЕ/мг белка
Клетки	50
Протопласты	30
Ядра	0
Митохондрии	0
Цитоплазматические мембраны	5
Микросомы	2
Гиалоплазма	40

мерных полифосфатов, вместе с которыми они вымываются из мембраны после обработки клеток улиточным ферментом.

Вторая категория подобных же ферментов грибов представляет собой эндоформы или деполимеразы, расщепляющие цепи полифосфатов с образованием олигополифосфатов или полифосфатных

Таблица 6.5

Ферменты грибов, расщепляющие полифосфаты. Полифосфат-деполимеразы (полифосфатполифосфогидролазы) с оптимальным pH 3,2—3,4, встречающиеся только у грибов (Кулаев, 1975)

Полифосфатполифосфогидролазы.

Тип реакции: $\text{ПФ}_{(m+n)} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ПФ}_m + \text{ПФ}_n$

цепей меньшей длины, чем исходная. Тип такой реакции показан в табл. 6.5, а результат ее обычно замеряется вискозиметрически. Ферменты этого типа характерны оптимумом в заметно кислой зоне pH (3,2—3,4). Они также активируются металлами, особенно цинком.

Локализация деполимераз еще в большей степени, чем у нейтральных полифосфатаз, привязана к поверхности клеточной мембраны, поскольку освобожденные от оболочки протопласты сохраняют их активность в размере порядка только около 0,1 от первоначальной (табл. 6.6). Есть основания предполагать, что эта категория энзимов может участвовать в переносе с поверхности клеточных мембран фрагментов синтезированных на них полифосфатов к другим клеточным структурам, работая таким образом как фосфотрансферазы. Регуляция действия всех описанных ферментов обмена полифосфатов очень сильно зависит от баланса соотношений полифосфатов и ортофосфата, являющегося основным механизмом, регулирующим направление их действия.

Таблица 6.6

Внутриклеточная локализация полифосфатдеполимеразной активности у *Neurospora crassa* в мЕ/мг белка (Кулаев, 1975)

Структура	Субстрат—полифосфаты с <i>n</i> числом мономеров фосфорной кислоты	
	<i>n</i> -290	<i>n</i> -180
Целые клетки	8,3	9,4
Протопласты	0,6	1,3
Ядра	0,15	0,20
Митохондрии	0,0	0,0
Микросомы	2,2	—
Гиалоплазма	0,0	0,0

2. Гидролазы

Гидролазами называют ферменты, катализирующие расщепление субстрата на его компоненты с присоединением к ним воды, и у грибов это часто бывают экзоферменты, выделяющиеся в окружающую среду. В их число входят карбогидразы, расщепляющие белки и пептиды, различные олиго- и полисахариды, протеолити-

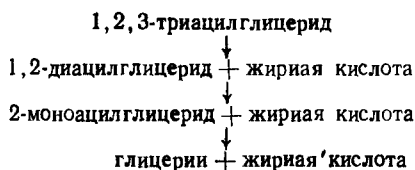
ческие ферменты, расщепляющие белки и пептиды, к которым при-
мыкают кератинолитические, разрушающие кератин рога, шерсти
и перьев, фибринолитические, гидролизующие фибрин крови,
а также расщепляющие фосфорные и другие сложноэфирные свя-
зи эстеразы, среди которых различают гидролизующие жиры ли-
пазы, фосфолипазы и рассмотренные выше фосфатазы.

Липазы и фосфолипазы¹. Липазы относятся к числу гидролити-
ческих ферментов из категории эстераз, расщепляющих жиры, ко-
торыми весьма богаты многие грибы, использующие жиры как
источник углерода. Липазы обильно встречаются у многих почвен-
ных, плесневых и паразитных грибов.

Реакция, производимая грибными липазами, большей частью
состоит в отщеплении от глицеридов жирных кислот, находящихся
в положении С-1 или С-3 атомов глицерина (табл. 6.7) в после-
довательном порядке от С-3 к С-1 ацильным группам.

Т а б л и ц а 6.7

**Катализируемая грибной липазой деградация
триацилглицерида (Weete, 1980)]**



Для отщепления последней ацильной группы в положении С-2
необходима изомеризация, переводящая ее в положение С-1 или
С-3. Это осуществляется грибами, поскольку они почти всегда
способны к полному деацилированию триглицеридов. Однако у не-
которых форм, например у *Aspergillus flavus*, такой позиционной
специфичности нет, а у *Geotrichum candidum* специфичность про-
является в приуроченности к ненасыщенным жирным кислотам со
структурой Δ^9 независимо от их положения в отношении атомов
углерода глицерина. Это наиболее специфичная из всех липаз
грибов.

У *Saccharomyces cerevisiae* липаза связана с клеточной мем-
браной и изолируется из нее при переваривании клеточной обо-
лочка. Большой частью липазы грибов относительно стабильны и
имеют оптимум действия при рН 8,0. Скорость гидролиза липазой
триглицеридов по положению С-1 у *Mucor javanicus* выше, чем ди-
глицеридов по положениям С-1, С-3, вероятно, потому, что дигли-
цериды менее электрофильны, и она падает в направлении: три-
глицериды → С-2, С-3-диглицериды → моноглицериды. Быстрее гид-
ролизуются также триглицериды, содержащие олеиновую и

¹ Даны рабочие названия ферментов по старой номенклатуре (Диксон,
Уэбб, 1982).

линолевую жирные кислоты, чем линоленовую, вероятно, в результате изменения под ее влиянием конфигурации триглицерида вследствие обилия двойных связей и затруднения образования его комплекса с энзимом.

Образование липаз грибами — важный элемент процесса сыроварения с применением грибных заквасок на основе *Penicillium roquefortii* и *P. kamemberti*. Острый вкус мягких сыров типа рокфора зависит в значительной мере от свободных жирных кислот, вторично образующихся сложных эфиров и альдегидов, являющихся конечными продуктами процессов, катализируемых липазами.

Виды грибов, обильно образующие липазы, обычно являются виновниками прогоркания масел или порчи масляных семян (Eggins, Coursey, 1968), туалетного мыла, коррозии и закупорки масляных и топливных баков, маслопроводов авиационных моторов, что приводило даже к воздушным катастрофам. Порча грибами произведений живописи с использованием масляных красок тоже зависит от разрушающих способностей этих грибов, обильно выделяющих липолитические ферменты (Курицына, 1968).

Фосфолипазы, гидролизующие фосфолипиды, изучались у немногих грибов. Всего насчитывают порядка пяти таких энзимов, обозначаемых как A_1 , A_2 , В, С и Д (рис. 6.9) и отличающихся по местам производимого ими гидролиза (Weete, 1980). Фосфолипазы A_1 и A_2 катализируют отщепление ацилированных жирных кислот по положению С-1 (A_1) и С-2 (A_2). Эти реакции способна производить также фосфолипаза В. Фосфолипазы С и Д являются собственно фосфатазами, так как они отщепляют фосфорную кислоту по ее —Р—О— связям, первая в месте контакта с С-3 атомом глицерина, а вторая с основанием, например с холином или этаноламином. Соответственно продуктами этих реакций оказываются в первом случае фосфорилированное основание (например, фосфатидилхолин), во втором одно основание (например, холин).

Обнаруженные у грибов фосфолипазы способны производить полное деацилирование 1,2-диацилглицерофосфатидов до глицеро-3-фосфата и двух жирных кислот, а также до 1,2-диацилглицерида и фосфорилированного основания (например, о-фосфатидилхолина) и являются широкоспецифичными. Фосфолипаза Д была открыта только у растений.

Наиболее полно была исследована фосфолипаза из *Penicillium notatum*, активная в отношении диацилфосфолипидов и стимулируемая кардиолипином и фосфатидилинозитом. Фосфолипаза А была найдена в сухих дрожжах и гидролизовала фосфатидилхолин, трансформируя его в лизофосфатидилхолин и глицеро-3-фос-

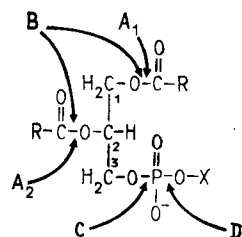


Рис. 6.9. Места действия на фосфолипиды фосфолипаз A_1 , A_2 , В, С и Д (Weete, 1980)

фатидилхолин. Фосфолипаза В из *P. notatum* активировалась анионами, возможно, вследствие участия их в диспергировании фосфолипидов в результате увеличения отрицательного потенциала субстрата. Это подтверждается возможностью их замены обработкой ультразвуком. Оптимальная активность фосфолипазы В из *P. notatum* достигается при pH 4,0 и усиливается при введении —S—S— связей. Фосфолипаза В была также найдена у *Sclerotium rolfsii* и имела при этом оптимум действия при pH 4,5.

О нахождении фосфолипазы С было сообщено некоторыми авторами для дрожжей, бактерий *Erwinia carotovora* и некоторых фитопатогенных грибов. Необычный энзим с фосфолипазной активностью был найден у *Rhizopus arrhizus*, катализирующий гидролиз триацилглицеридов в положении С-1 и С-3. Сходный с энзимом *Rhizopus* фермент был обнаружен в панкреатической железе свиньи.

Карбогидразами называют ферменты, производящие сопровождаемое гидролизом расщепление углеводсодержащих безазотистых соединений, например, различной степени сложности углеводов. Поскольку именно такие субстраты чаще всего используются грибами как источник углерода, ферменты этого типа, образуемые ими, весьма обильны и разнообразны.

К ним относятся прежде всего ферменты, действующие на дисахариды, такие как инвертаза (или сахароза), расщепляющая сахарозу на фруктозу и глюкозу, трегалаза и мальтаза, делящие соответственно на две молекулы глюкозы трегалозу и мальтозу, и лактаза, расщепляющая на глюкозу и галактозу дисахарид лактозу. Ферменты этой категории, будучи широко распространены у грибов, имеются все же не у всех. Например, у *Chaetocerotostoma longirostre* отсутствует инвертаза, и при росте без глюкозы, которая способствует образованию у нее красного пигмента, ее колония на среде с сахарозой остается неокрашенной. Вследствие этого данный вид может служить тестом для обнаружения инвертазы у других грибов, в совместной культуре с которыми на среде с сахарозой его колония становится окрашенной пигментом, синтезируемым на базе глюкозы, образующейся в результате действия инвертазы культивируемого вместе с ним вида гриба.

Ферменты этого типа могут быть не только конститутивными, но и адаптивными. Например, у *Saccharomyces fragilis* таковым является инвертаза, образование которой усиливается очень резко на среде с сахарозой и которая почти не образуется на средах с рафинозой, лактозой или мелибиозой (Девис и др., 1966). У других дрожжей адаптивным ферментом является энзим, участвующий в усвоении галактозы, образование которого стимулируется выделенным из них термостабильным фактором.

Трегалаза, видимо, также является адаптивным ферментом у миксомицета *Dictyostelium discoideum*, постепенно накапливающимися у него в процессе прорастания спор (Cotter, Raper, 1966). Кроме миксомицета *Dictyostelium* трегалаза была также обнару-

жена в мицелии и склероциях в культуре *Sclerotinia sclerotiorum* (Wang-Sy-Jing, Le Tourneau, 1972). Очищенный фермент имел оптимальную активность в пределах pH около 5,0 и константу Михаэлиса, равную $1,7 \cdot 10^{-3}$. Еще ранее трегалаза была также обнаружена у базидиомицета *Schizophyllum commune* (Williams, Niederpruem, 1968).

Некоторые дрожжи накапливают расщепляющие дисахариды ферменты в больших количествах, что позволяет использовать их в промышленных целях. Например, к числу таких видов относится *Fabrospora fragilis*, образующая β -галактозидазу (лактазу) и оказавшаяся наиболее эффективной среди пятидесяти испытанных одновременно с ней штаммов дрожжей.

Олигосахариды с α -D-галактозным остатком, широко распространенные у растений и животных, гидролизуются α -галактозидазой, встречающейся как среди дрожжей, так и нитчатых грибов. Среди 89 культур дрожжей, принадлежащих к 21 роду, она обнаружена только у двух испытанных видов рода *Schwanniomyces*, *S. occidentalis* и *S. alluvius*, причем наиболее активен был первый из этих видов, культивируемый на среде с молочной сывороткой (Улезло и др., 1980). Среди нитчатых дейтеромицетов хорошим продуцентом α -галактозидазы оказался штамм из рода *Cephalosporium* (*Cephalosporium* sp. 237), из культуральной жидкости которого энзим осаждался этанолом или ацетоном и гидролизировал все три использованных субстрата: *n*-нитрофенил- α -D-галактопиранозид (*n*-НФГ), к которому его сродство было наибольшим, мелибиозу и рафинозу, но с оптимальной активностью при разных pH. Для гидролиза *n*-НФГ оптимальная активность находилась при pH 5,5, для мелибиозы — при pH 5,0 и для рафинозы — при pH 6,0. Препарат фермента содержал примеси протеазы и инвертазы, был стабилен в диапазоне pH от 5,0 до 9,0 и терял 40% активности в течение 10 мин при 50 °C. Для гидролиза субстрата *n*-НФГ оптимальная активность энзима наблюдалась при 40 °C (Запрометова и др., 1982).

Среди ферментов, расщепляющих сложные полисахариды, наиболее распространенным у грибов энзимом является амилаза. Она представляет собой, по существу, не один фермент, а комплекс энзимов, гидролизующих крахмал. В составе этого комплекса в настоящее время числятся (Яровенко, Устинников, 1975): 1) α -амилаза (по промышленной терминологии АС), гидролизующая крахмал по связям 1—4 до неокрашивающихся йодом декстринов, а также до мальтозы и глюкозы; 2) декстриназа (ДС), гидролизующая конечные декстрины до редуцирующих сахаров, иначе называемая олиго-1-6-глюкозидазой по ее способности расщеплять крахмал по 1-6-глюкозидным связям; 3) обнаруженная Фениксовой и Шиловой (1964, 1970) в культуре *Aspergillus awamori*, а позднее и у многих других плесеней глюкоамилаза, гидролизующая крахмал до глюкозы как по связям α -1,4, так и по α -1,6 (ГА). К числу ферментов комплекса амилазы присоединяют обычно и мальтазу (МС).

Декстриназа помимо способности расщеплять крахмал по 1-6-глюкозидным связям оказалась способной формировать из глюкозидных остатков изомальтозу, панозу, мальтотриозу и другие сходные сахара, т. е. обладала одновременно свойствами транс-гликозилазы с общей схемой действия фермента:

Две молекулы мальтозы $\rightleftharpoons$ мальтотриоза + глюкоза.

Фермент этого типа особенно характерен для серии вида *Aspergillus niger* (*A. niger*, *A. batatae*, *A. awamori*), но имеется также и у *A. oryzae*, хотя последний характерен больше высокой активностью α -амилазы.

α -Амилаза грибов ингибируется тяжелыми металлами, а кальций является ее важным компонентом, стабилизирующим конформацию фермента. Она достаточно кислотоустойчива, так как сохраняет активность при pH 2,5 в течение 30 мин и имеет оптимальную активность при pH порядка 4,5—4,8. Большинство глюкоамилаз также действуют в кислой зоне pH (3,5—5,5), но у некоторых грибов, например у *Saccharomyces italicus*, встречаются нейтральные глюкоамилазы с активностью при pH от 6,0 до 7,5. Этот фермент способен гидролизовать даже 1-3-глюкозидные связи, и не только крахмал, но и конечные декстрины и гликоген. Он был обнаружен также у мукорового гриба *Rhizopus delamar* и у *Endomycopsis* sp. Температурные пределы его действия колеблются от 40 до 60 °C.

Амилаза почти всегда является конститутивным ферментом, даже у дереворазрушающих грибов (Луг, 1959b), и широко распространена в очень разнообразных таксономических группах. Не содержит ее только некоторые оомицеты, например виды рода *Phytophthora*, выделяющие вместо нее вещества, индуцирующие биосинтез амилазы в пораженных ею клубнях картофеля. У почвенных плесневых грибов из родов *Aspergillus* и *Penicillium* амилаза распространена особенно широко, и именно виды этих родов обычно служат ее источниками для промышленности. Комплексы ферментов, составляющих их систему, гидролизующую крахмал, даже у видов одного рода могут быть неодинаковыми, от чего зависит выбор разных продуцентов для различных практических целей. Например, у *Aspergillus oryzae* преобладает α -амилаза с оптимумом активности при pH 5,0—5,4, тогда как группа *A. niger* обычно богаче глюкоамилазой, декстриназой и мальтазой. Индуктором образования у *A. niger* амилазы является продукт гидролиза крахмала мальтоза, а глюкоза подавляет ее синтез.

Среди видов рода *Ascochyta* и у близкого к ней рода *Phoma* присутствуют одновременно и α -амилаза, и глюкоамилаза, и отдельные виды отличаются не столько по относительному их количеству, сколько по общему объему их продукции и скорости их формирования. Наиболее продуктивной оказалась в заданных условиях среды *Ascochyta cucumeris*, а наименее — *A. pisi* и представитель рода *Phoma*, *P. medicaginis* (Решетникова, Успенская, 1981).

Амилаза *Penicillium chrysogenum* подавлялась солями аммония, а) активировалась фенилуксусной кислотой и кукурузным экстрактом и оказалась наиболее активной в нейтральной зоне pH от 6,4 до 7,0.

Близкому к амилазе ферменту, производящему гидролитическое расщепление инулина, было присвоено название инулазы, но в данное время ферменты этого типа называют фруктангидролазами. Согласно ранним исследованиям инулаза является адаптивным ферментом, образуемым *Aspergillus niger* в основном при росте его на среде с инулином, но не на средах с глюкозой или мальтозой. Название фруктангидролаз присвоено ферментам, приспособленным к субстратам, в состав которых (как, например, в состав инулина) входит фруктоза. Фруктангидролаз различают три категории: 1) собственно инулазу, гидролизующую только инулин; 2) менее специфичную гидролазу, расщепляющую кроме инулина леван и сахарозу; 3) леваназу, фруктангидролазу, расщепляющую только леван и освобождающую из него помимо фруктозы ее олигосахариды (Элисашила и др., 1980). Последняя оказалась полезной в стоматологии для профилактики и лечения кариеса.

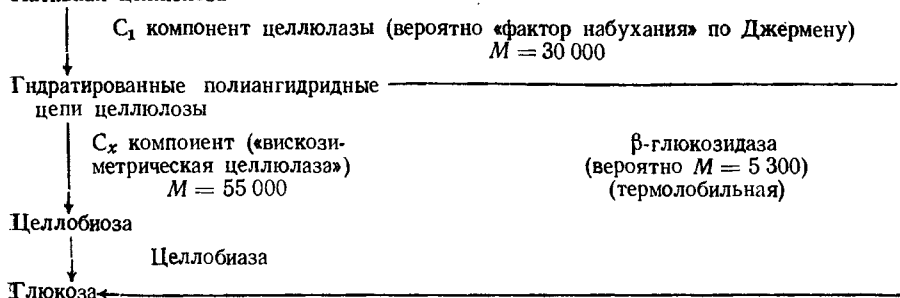
Внеклеточную леваназу оказалось возможным получать из культуральной жидкости *Fusarium solani* 68 при помощи осаждения ее сульфатом аммония и гель-хроматографии на сефадексе G-150. Максимальная активность ее наблюдалась при pH 6,8, температуре 45°C и концентрации полисахарида 6,7 мг/мл. Фермент отличался стабильностью при pH от 5,0 до 7,5 и при 40—45°C. Константа Михаэлиса для этого энзима была равна $1,5 \cdot 10^{-6}$ М.

Комплекс ферментов, разрушающих клетчатку до целлюлозы и затем до глюкозы, носит общее название целлюлазы. Эффект ее действия в отношении древесины особенно ярко виден у грибов, возбудителей ее деструктивной гнили, при которой древесина теряет свою волокнистую структуру, буреет, растрескивается и легко растирается в порошок, что особенно характерно для поражения домовыми грибами — *Serpula (Merulius) lacrymans*, *Coniophora puteana* (*C. cerebella*) и другими. Этапы разрушения древесины этими и другими грибами были тонко изучены на цитохимическом и электронно-микроскопическом уровне (Liese, Schmied, 1962; Liese, 1970; Peek et al., 1972).

Уже более двадцати лет назад было установлено, что целлюлоза, как и амилаза, у большинства из ее продуцентов представлена комплексом из нескольких ферментов, свойства которых были первоначально изучены (Jermyn, 1956) на модели дейтеромицета *Stachybotrys atra*, а позднее на других объектах (Selby, 1968). В итоге было установлено наличие у грибов комплекса из трех энзимов (рис. 6.10): 1) фактора набухания, вызывающего подготовку к дальнейшему расщеплению, и набухание высококристаллической целлюлозы, по-видимому, идентичного фактору C_1 по классификации Селби; 2) термостабильной «вискозиметрической» целлюлозы, эндоэнзима, разрушающего несколько более низкомо-

лекулярную целлюлозу, понижая ее вязкость вследствие ее расщепления на цепи меньшей длины. Конечными продуктами ее действия являются сначала олигосахариды, а потом целлобиоза и глюкоза. Расщеплять целлобиозу она не может. Видимо, она идентична с C_x -фактором по классификации Селби; 3) термолабильной β -глюкозидазы, экзоэнзима, расщепляющей β -глюкозидную связь

Нативная целлюлоза



Раствор фермента	Относительная целлюлазная активность
C_1	1
C_x	5
$C_1 + C_x$	102

Рис. 6.10. Схема последовательности действия целлюлитических ферментов и относительной их активности поодиночке и в смеси (Selby, 1968)

концевого мономера глюкозы в цепи, которая является единственным продуктом действия этого фермента. Как и мальтаза в комплексе амилазы, в случае комплекса целлюлазы в него входит энзим целлобиаза, расщепляющий на две молекулы глюкозы составляющий клетчатку дисахарид целлобиозу (см. рис. 6.10).

Механизм действия α - и β -глюкозидаз, соответственно расщепляющих полимеры целлюлозы по α - и β -связям, изучался тем же Джермином (Jermin, 1958) и, по его мнению, он состоит в образовании тройного комплекса — энзим — донор — акцептор, где акцептором обычно является вода. При разрушении этого комплекса получается конечный продукт гидролиза — глюкоза. Молекулярная масса приведенных на рис. 6.10 энзимов согласуется с глубиной их действия. Она равна 55 000 для «вискозиметрической» целлюлазы, 30 000 для фермента C_1 (фактора набухания) и всего около 5300 для β -глюкозидазы. В комплексе действие этих ферментов резко усиливается, как это видно из сравнения гидролитического эффекта компонентов комплекса поодиночке и совместно (см. рис. 6.10).

Продолжение изучения целлюлозолитических ферментов грибов в последнее время, проводившееся с привлечением продуцентов из дейтеромицетов, в частности вида *Geotrichum candidum* (Тиунова и др., 1982), показало наличие среди β -глюканаз специализированных типов энзимов по отношению к определенным глюкозидным связям (1-3, 1-4 или 1-6). Использование в качестве субстрата ламинарина позволило выявить у *G. candidum* активность 1-3- β -глюканазы, пустулина — 1-6- β -глюканазы. Выявлялись также при росте в течение 75—100 ч 1-4- β -глюканаза (S_x -фермент), образующаяся после 70 ч роста β -глюкозидаза, расщепляющая целлобиозу, и по расщеплению хлопкового волокна C_1 -фермент Селби. Исследование β -глюканаз с помощью изоэлектрического фокусирования в градиенте pH показало, что все эти энзимы являются кислыми белками с изоэлектрическими точками в пределах от 1,3—2,0 до 6,4 и каждый тип, судя по числу пиков кривой элюции, содержит от четырех (у 1-3- β -глюканазы) до семи (у 1-4- β -глюканазы) фракций изотимов.

Изучались также экзоцеллюлазы дереворазрушающего базидиомицета *Irpex lacteus* (Kanda et al., 1978). Проводилось также специальное исследование у 31 вида грибов-дереворазрушителей активности C_1 -фермента, которое показало, что он обнаруживается только у 7 из них, в основном являющихся возбудителями бурой гнили. К их числу принадлежали *Coniophora areda*, *C. olivacea*, *C. puteana*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Paxillus panuoides*, *Serpula himantoides* и *S. pinastri* (Nilsson, 1974).

Наиболее энергичными разрушителями целлюлозы естественно являются дереворазрушающие грибы-базидиомицеты, которые и оказались наилучшим образом изученными в отношении их целлюлаз (см., например, Лыг, 1959b, 1960; Musilek, 1981; Nilsson, 1974). Комплексы обнаруживаемых у этих грибов целлюлитических ферментов были различны в зависимости от вида гриба. Так, у *Polyporus annosus* и *Flammulina (Collybia) velutipes* (Norkrans, 1957; Лыг, Ziegler, 1959) была найдена как термостабильная целлюлаза, так и термолабильная β -глюкозидаза с различной активностью у разных штаммов *Flammulina*, тогда как у *Hydnum heningsii* и *Polyporus schweinitzii* оказалась только β -глюкозидаза, дающая в качестве продукта гидролиза одну глюкозу. Напротив, у *Polyporus betulinus* по понижению вязкости карбоксиметилцеллюлозы была обнаружена только «вискозиметрическая» целлюлаза (Bell, Burnett, 1966). Помимо указанных здесь видов дереворазрушающих грибов целлюлаза была обнаружена у рода *Irpex*, у которого она стимулируется марганцем, у *Phellinus igniarius* (Стайченко, Федоров, 1969), у *Polyporus abietinus*, *Tricholoma*, *Poria vaillantii* и у видов *Corticium*.

Среди почвенных дейтеромицетов также встречается большое количество продуцентов целлюлаз, в чем можно убедиться, выращивая их при посеве почвенной суспензии или комочков почвы на фильтровальную бумагу (Веропа, Lipidi, 1966) или на среду с добавкой в качестве источника углерода целлюлозного порошка.

К числу целлюлозоразрушающих форм почвенного происхождения принадлежат различные виды *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Humicola*, *Malbranchea*, *Sporotrichum*, *Thermoascus* и другие. Много целлюлозоразрушителей оказывается среди термофильных видов. К числу разрушителей целлюлозы относятся также разрушители бумаги *Eidamella deflexa*, *Sporotrichum bombycinum*, *Aspergillus terreus* и *Penicillium purpurogenum* (Нюкша, 1969), а также гриб *Archangium violaceum*. Однако из числа дейтеромицетов наиболее активными и наилучше изученными продуцентами целлюлазы оказались *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria* (Whitaker, 1954, 1956) и *Stachybotrys atra* (Жермун, 1956). У последнего из этих грибов был обнаружен набор из четырех компонентов целлюлазы, тогда как у *Myrothecium verrucaria* и *Aspergillus niger* установлены термостабильная целлюлаза и термолабильная β -глюкозидаза. У *Myrothecium* β -глюкозидаза оказывается более эффективной, если длина цепочек разрушаемых ею олигосахаридов возрастает с двух до пяти мономеров глюкозы в их составе.

Целлюлазы, видимо, в большинстве случаев являются адаптивными энзимами, которые не образуются на средах с глюкозой и целлобиозой, а главным образом при росте на средах с клетчаткой (Лыг, 1959). Это было установлено для *Tricholoma*, *Polyporus annosus* (Норкранс, 1957), *Fomes pinicola*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor* (Рисе, Левинсон, 1952) и целого ряда других грибов-деревоуничтожителей. Оптимальное значение pH для активности этих ферментов находится обычно в пределах от 5,0 до 6,0.

К наиболее распространенным у древесных растений полимерам, которые ранее обобщали в категорию гемицеллюлоз, относятся ксиланы, преобладающие у лиственных пород, и маннаны, встречающиеся в большом количестве у хвойных. Расщепляющие их ферменты ксилазы и маннаназы встречаются обильно как у деревоуничтожающих грибов-трутовиков, так у многих сумчатых грибов, например *Chaetomium globosum* (Сörenсен, 1957), и дейтеромицетов. Обильны они и у паразитических грибов. Среди последних гемицеллюлазы изучались у *Fusarium roseum*, *Sclerotium rolfsii*, у *Botrytis cinerea* и *Aureobasidium pullulans* (Берндт, Лисе, 1971). При этом у *Botrytis cinerea* и *Aureobasidium pullulans* была обнаружена манианаза, у *Chaetomium globosum* ксиланаза, а у *Sclerotium rolfsii* оба этих энзима с дополнением галактаназы и α -1,6-галактозидазы. *S. rolfsii* оказался способным расщеплять галактоманнаны, а ряд других грибов — разнообразные пентозаны. По-видимому, большинство энзимов этого типа являются у грибов адаптивными, например, у большей части грибов образование ксиланазы стимулировалось ксиланом (Сörenсен, 1957; Лыг, 1959). Оптимальное значение pH для активности этого фермента лежит, по некоторым данным, в пределах 3,0—3,8, а продуктом гидролиза является ксилобиоза, расщепляющаяся далее до ксилозы (Рипачек, 1967).

Поскольку маннаны более широко представлены у хвойных, анализировали наличие соответствующих ферментов у паразитов этих пород деревьев. Ферменты, расщепляющие α -D-маннозидные связи, были найдены у паразита ели трутовика *Phellinus abietis* (Zouchová et al., 1977a, б). У *P. abietis* были обнаружены два типа подобных экстрацеллюлярных энзимов — типа экзоманнаназы, отщепляющей конечную группу маннозы, и эндоманнаназы, расщепляющей маннан на его олигомеры, а также α -маннозидазу.

Пектолитические энзимы широко распространены как у дереворазрушающих, так и у почвенных и особенно у фитопатогенных грибов, у которых изучалась пектолитическая способность более чем для восемнадцати видов в связи с предполагаемой ролью этих энзимов в патогенезе или в проникновении в растения через их корни.

Среди пектолитических энзимов, которые, как и другие гидролазы, часто являются комплексом ферментов, различают четыре вида: 1) протопектиназа, или пектинлиаза, освобождающая пектин из его лабильного соединения с клетчаткой; именно этот энзим считается основным виновником мацерации тканей растений, и испытывают его обычно по этому симптому при посеве гриба — продуцента на ломтики картофеля; 2) полигалактуроназа, или пектиназа (ПГ), определяемая чаще всего по понижению вязкости раствора пектина или пектата кальция, производящая разрыв полимерной молекулы полигалактуроновой кислоты, составляющей пектин, по α -1,4-уронидным связям на более низкомолекулярные фрагменты или мономеры галактуроновой кислоты (рис. 6.11);

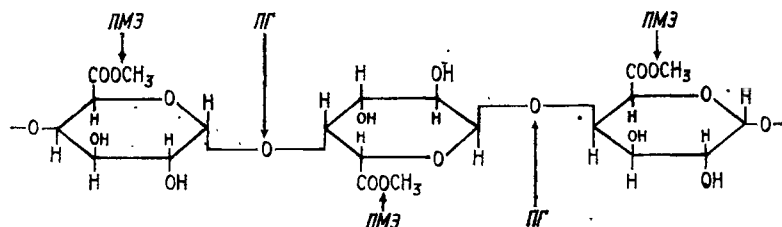


Рис. 6.11. Действие на пектин полигалактуроназы (ПГ) и пектинметилэстеразы (ПМЭ) (Банфилд, 1963)

3) пектинметилэстераза, или пектаза (ПМЭ), определяемая по титрованию освобождающихся кислых групп полигалактуроновой кислоты или спектрофотометрически; она представляет собой эстеразу, расщепляющую эфирную связь полигалактуроновой кислоты с метиловым спиртом (см. рис. 6.11). У видов, способных расщеплять высоко метоксилированные пектины, она встречается обычно в паре с полигалактуроназой (ПГ), так как последняя неспособна расщеплять такие пектины без их предварительного деметоксилирования; 4) обнаруженная позднее всех других пектолитических

энзимов пектинтрансэлиминаза (ПТЭ), расщепляющая уронидные связи пектина без его предварительного деметоксилирования.

Этот энзим сильно отличается от двух предыдущих, имеющих оптимум действия в кислой среде (при pH 4,0—5,0), тем, что его максимальная активность проявляется в щелочном диапазоне между pH 7,5 и 8,5 (Ayers, Papavizas, Diem, 1966; Васильева, Метлицкий, 1968; Васильева и др., 1968). Если исходить из этого обстоятельства, то отличающиеся по оптимальным значениям pH пектиновые энзимы *Botrytis cinerea* (оптимум pH 4,0—5,0) и *Pythium debarianum* (оптимум pH 8,0—9,0) должны быть: первый — полигалактуроназой, а второй — пектинтрансэлиминазой соответственно (Ashour, 1954). Пектолитический энзим *Aureobasidium pullulans* также оказывается по этому признаку пектинтрансэлиминазой (Berndt, Liese, 1971).

Полигалактуроназа, встречающаяся у *Neurospora crassa*, по ее описанию несколько отличается от обычной по оптимальному для ее действия pH и термолабильностью. Она разрушается при 70 °C и дает в качестве продуктов гидролиза довольно высокомолекулярные полиурониды с молекулярной массой около 1300. Однако последний признак не особенно характерен, поскольку и обычная ПГ дает первоначально высокомолекулярные продукты гидролиза, постепенно распадающиеся при длительных экспозициях на мономеры. В последнее время пектинметилэстеразу и полигалактуроназу рассматривают как единый ферментный комплекс, называемый полиметилгалактуроназой, различая лишь его экзoформу, отщепляющую концевую молекулу галактуроновой кислоты, и эндoформу этого энзима, расщепляющую пектин на его олигомеры (Михайлова и др., 1982).

Относительно степени адаптивности пектолитических энзимов единодушного мнения пока нет и они в этом отношении еще недостаточно изучены. Полигалактуроназа рассматривалась первоначально как конститутивный энзим (Gäumann, 1949), что, видимо, подтверждается и для *Penicillium chrysogenum*, хотя пектинметилэстераза у него адаптивна. Однако у дереворазрушающих грибов ПГ адаптивна и резко стимулируется на средах с пектином (Луг, 1959, 1960). Точно так же оказываются адаптивными энзимы этого типа у *Aspergillus niger* (Фениксова, Молдабаева, 1967). По поводу ПГ *Botrytis cinerea* возникают значительные разногласия. Одни считают ее у всех видов *Botrytis* конститутивным (Талиева, Плотникова, 1962), другие находят, что ее образование стимулируется пектином, т. е., что она адаптивна (Ashour, 1954). У этого гриба, а также у *Sclerotinia sclerotiorum* декстроза даже на среде с пектином угнетала образование ПГ. Тоже касается ПГ *Rhizoctonia solani*, которая в одних работах фигурирует как конститутивная, в других — как адаптивная (Ayers, Papavizas, Diem, 1966), как и соответствующий фермент гриба *Aphanomyces euteiches*.

Пектинтрансэлиминаза (ПТЭ) у *Rhizoctonia solani* оказалась адаптивной, а у *Pythium debarianum* конститутивной. Единствен-

ный пектолитический фермент, найденный у *Phytophthora infestans*, — пектинметилэстераза оказалась конститутивной (Clarke, 1966).

Одновременное наличие у продуцента эндо- и экзоформ ПГ можно установить по непропорциональности между понижением вязкости и увеличением количества редуцирующих концевых остатков мономеров, что особенно выявляется в случае наличия одной эндоформы фермента. У грибов встречаются и те и другие формы фермента, в частности у дрожжей. У дереворазрушающих грибов — трутовиков установлена экзо-ПГ (Луг, 1959; 1963), у *Neurospora* — эндо-ПГ, так же как и у *Aphanomyces euteiches*. При исследовании ПГ в конидиях *Colletotrichum orbiculare* как эндо-, так и экзоформа ПГ показали более высокую активность в их матриксе, чем в нативном материале, что говорит о поверхностной локализации их в клетках.

Пектинолитические ферменты грибов встречаются в самых разнообразных сочетаниях, хотя наиболее часто обнаруживается у них полигалактуроназа, найденная в спорах ржавчины *Puccinia glumarum*, *P. tritici* и *P. suaveolens* (Талиева, Плотникова, 1962), у дрожжей, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum*, *Neurospora crassa* и *Aphanomyces euteiches*. В сочетании с протопектиназой она была обнаружена в спорах *Aspergillus niger* и у трех видов *Botrytis* — *B. cinerea*, *B. anthophila* и *B. allii*, а также у *Sclerotinia sclerotiorum* и в сочетании с пектинметилэстеразой у *Ceratocystis fimbriata* и *Verticillium dahliae*, а с обоими этими ферментами (протопектиназой и ПМЭ) у *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (Васильева, Метлицкий, 1968). Без сопровождения другими пектолитическими компонентами протопектиназа была также найдена у *Colletotrichum trifolii*, пектинметилэстераза у *Phytophthora infestans* (Clarke, 1966) и *Sclerotinia sclerotiorum*, а пектинтрансэлиминаза у *Rhizoctonia solani* (Ayers et al., 1966) и *Pythium debaryanum*.

Как можно видеть из этого перечня, пектолитические ферменты особенно обильны у паразитных грибов, поражающих корни растений или проникающих в них через корни. В этом отношении особое внимание привлекают два фермента: протопектиназа и пектинтрансэлиминаза. По материалам Талиевой и Плотниковой (1962), протопектиназа из трех видов рода *Botrytis* оказалась наиболее выраженной у форм с большей адаптацией к паразитизму (*B. anthophila* и особенно *B. allii*) по сравнению с сапротрофным *B. cinerea*, что авторы связывают с транспортной, т. е. способствующей проникновению в растение функцией этого фермента. Вторым ферментом транспортного назначения, вероятно, окажется, специально для обитателей аридных (пустынных) щелочных почв, пектинтрансэлиминаза с ее оптимумом эффекта при pH около 8,0, очень близким к pH почвенного раствора этой зоны. Ферменты типа ПГ и ПМЭ с оптимумом действия при pH, близким к кислотности клеточного сока растений (от 4,0 до 5,0), вероятно, несут скорее «трофическую функцию» (по терминологии Талиевой) и шире всего представлены у почвенных сапротрофов и грибов де-

реворазрушителей, что вполне соответствует занимаемой ими экологической нише.

Пектолитические ферменты грибов получают все большее практическое значение и широко изучаются в этом плане (Банфилд, 1963). Известно, например, что мощный пектолитический комплекс возбудителя так называемой «благородной гнили винограда», *B. cinerea*, успешно использовался для осветления десертных вин при их созревании. Для стабилизации вин и при приготовлении фруктово-ягодных вин и соков пектолитические ферменты стали применять и в Советском Союзе, например, при изготовлении вин из крыжовника или черной смородины (Датунашвили и др., 1976; Кишковский и др., 1974), однако значение их для промышленности этим не исчерпывается. Они оказались очень полезными при обработке различных растительных продуктов, например при экстракции крахмала, витаминов, лекарственных веществ, при осахаривании сельскохозяйственных отходов или при заготовке кормов в животноводстве, в связи с чем в последнее время очень повысился интерес к изучению именно этого класса ферментов.

В поисках полезных для различных целей продуцентов пектолитических ферментов были обследованы разнообразные роды грибов, например 340 штаммов у 38 видов рода *Penicillium* и 132 штамма у 13 видов *Fusarium* (Айзенберг, Билай, 1970; Девдариани и др., 1982), *Trichoderma koningii* (Fanelli et al., 1978) и ряд базидиомицетов, например трутовики *Fomitopsis cytisina* и *Irpex lacteus* (Kawai et al., 1978). В ряде из этих работ выяснилось, что наибольший эффект в отношении мацерации растительных тканей дает, как и в случае целлюлаз, применение комплекса ферментов. Так, например, совместное применение полиметилгалактуроназ (ПМГ) и пектинтрансэлиминазы (ПТЭ) из *Penicillium digitatum* для мацерации тканей листа и клубня картофеля можно объяснить их различной активностью в отношении пектинов разного происхождения. Эндо-ПМГ *P. digitatum* лучше всего гидролизовала свекловичный и лимонный пектины, экзо-ПМГ — свекловичный и лектовую кислоту, а ПТЭ — яблочный и не действовала на пектовую кислоту. Вероятно, при этом играло роль не только сродство ферментов к разным пектинам, но и различия в оптимальных для их действия рН, которые имеют значения для экзо-ПМГ — 4,5, для эндо-ПМГ — 5,0, а для ПТЭ — 9,0 (Михайлова и др., 1982). Пектолитические ферменты *P. digitatum* угнетаются ионами тяжелых металлов, как Fe^{2+} , Ag^{+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , и натрия, а также редуцирующими, поверхностно-активными и хелатообразующими веществами. Эндо-ПМГ несколько активируются ионами Ca^{2+} , а экзо-ПМГ — Mg^{2+} и Al^{2+} .

Изучались также пектолитические ферменты, образуемые неуказанными авторами видами родов *Penicillium* и *Fusarium*, которые наилучшим образом очищались при помощи осаждения их ацетоном из сконцентрированной культуральной жидкости после роста грибов на среде со свекольным жомом (Давдариани и др., 1982). Полученный пектолитический комплекс содержал три пек-

толитических фермента в препарате из *Penicillium* и четыре в препарате из *Fusarium* с оптимальными pH 4,5 и температурой 40°C для активности препарата из *Fusarium* и pH 5,0 и температурой 50°C для активности препарата из *Penicillium*. В полученном препарате из *Fusarium* преобладали экзо-ПГ и эндо-ПГ, в препарате из пеницилла — пектинметилэстераза. ПТЭ была обнаружена только у *Fusarium*, и, кроме того, в обоих препаратах имелась большая примесь кислой протеазы и незначительная целлюлаз.

С позиций определения роли пектолитического комплекса энзимов в фитопатологии изучались также ферменты возбудителя вилта хлопчатника, *Verticillium dahliae*, у которого были обнаружены ПГ, накапливающиеся при низком pH среды (5,5), и ПТЭ, синтезирующаяся при более высоком (pH 7,0—7,5). Оптимум роста и формирования ПТЭ был обнаружен при температуре 28—30°C. Влияние на заболевание вилтом метеорологических факторов авторы связывают с тормозящим влиянием температуры выше 30°C на образование патогеном ПТЭ (Согдиева, Васильева, 1975).

Поскольку мацерация растительных продуктов зависит не только от пектолитического комплекса, а часто от дополняющих их целлюлаз и протеаз, комплексные смеси, подобные получаемым Девдариани с сотр. (1982), оказываются более действенными, чем индивидуальные энзимы. Однако возможен и другой подход к этой практической проблеме. Помимо использования естественно синтезирующихся продуцентов смесей гидролитических энзимов применяются также препараты, составленные путем смешивания полученных от разных продуцентов или путем последовательного экспонирования мацерлируемого материала в ряде таких энзимов. Одна из таких процедур была разработана при мацерации листьев растений путем чередования обработки сначала пектофоетидином TOX и затем целлюлазой из термотолерантного штамма *Aspergillus terreus* (Логинова и др., 1980). Удобный для такой мацерации комплекс энзимов, содержащий целлюлитические, пектолитические энзимы, глюканазы и ксиланазы, был обнаружен у *Fomitopsis cytisina* и *Irpex lacteus* (Kawai et al., 1978; Noguchi et al., 1978), причем последний трутовик продуцировал также значительное количество протеиназы, что делало его пригодным и для целей пищевого производства (Suga et al., 1978). Ранее, для целей переработки кормов для сельскохозяйственных животных, исследовался также состав энзимного комплекса, образуемого трутовиком *Trametes sanguinea*, который оказался продуцентом протеазы, целлюлазы, глюканазы и пектиназы при росте в погруженной культуре.

Исследование семи энзимов (протеазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, амилазы, лакказы, каталазы и пероксидазы) плодовых тел 334 базидиальных и сумчатых макромицетов и их изозимов при анализе с помощью электрофореза в геле оказалось полезным для целей хемотаксономии (Lamaison, 1976).

Хитиназа несколько отличается от других карбогидраз тем, что она гидролизует азотсодержащее соединение — хитин. Однако ее целесообразно рассматривать вместе с ними, так как хитин по

своей структуре идентичен полисахаридам и отличается от них лишь тем, что составляющие его мономеры представляют собой ацетильные производные глюкозамина. Хитиназа гидролизует хитин до ацетилглюкозамина и широко распространена у грибов. Ее можно обнаружить в плодовых телах базидиомицетов, как *Coprinus comatus*, *Phallus impudicus*, *Fistulina hepatica*, и особенно у видов дождевиков *Bovista* и *Lycoperdon*. Этот фермент относительно термостабилен и активируется белком сыворотки крови. Появились также сообщения о другом ферменте, свойственном мицелиальным грибам (например, *Mucor rouxii*), способном деацетилировать хитин с образованием хитозана.

Хитиназа является одним из основных компонентов комплекса, составляющего улиточный фермент, используемый в экспериментальной микологии для получения сферопластов грибов, лишенных клеточной оболочки. Из 35 видов грибов, исследованных в отношении образования подобного комплекса ферментов, были отобраны *Coprinus macrorhizus* f. *microsporus*, *C. radians*, *C. micaceus*, *Daedaliopsis styracina* и *Irpex lacteus* (Kawai, 1970). Наиболее активные продуценты этого комплекса, содержащего глюканазы, манна-назы, хитиназу, целлюлазы и протеазу, — *Coprinus macrorhizus* f. *microsporus* и *C. radians* — были способны гидролизовать протеины, глюканы, маннаны и хитин.

Активно гидролизующий хитин дождевик — *Lycoperdon perlatum* — образует ферментный комплекс, растворяющий оболочки дрожжей (Musilkova et al., 1975a, б). Препарат этого комплекса как из природных плодовых тел, так и из ферментного концентрата, полученного при росте мицелия в погруженной культуре, полностью заменяет ферментатически активный препарат из улитки *Helix pomatia*.

Ферменты, участвующие в синтезе олиго- и полисахаридов, относятся к синтетазам и включают обычно в качестве кофакторов уридинилловые, реже гуанилловые нуклеотиды. При исследовании хлорнокислых экстрактов из мицелия грибов в них обычно обнаруживается при хроматографическом разделении большое количество таких нуклеотидов, как уридиндифосфатглюкоза (УДФГ) и уридиндифосфатацетилглюкозамин (УДФАГ), — переносчиков мономеров глюкозы и ацетилглюкозамина (Крицкий, 1965; Мансурова, 1966).

Синтетаза специфичного для грибов дисахарида трегалозы или микозы с рациональным названием УДФ-глюкозо-D-глюкозо-6-фосфат-1-глюкозилтрансферазы была обнаружена у гриба-слизевика *Dictyostelium discoideum*. Количество этого фермента особенно нарастало у *Dictyostelium* к моменту образования у него плодовых тел (Roth, Sussman, 1966).

Дубильные вещества, в том числе и танин, представляют собой глюкозиды кислот, являющихся производными полифенолов, в особенности галловой кислоты, содержащей три гидроксильные группы и карбоксил в пареположении к средней из них (рис. 6.12). При гидролизе ферментом танназой танин присоединяет воду и

расщепляется на галловую кислоту и сахара (Фостер, 1950). Танназа была открыта Ролленом еще в 1860 г., а продуцент ее *Aspergillus niger*, обнаруженный при брожении галловых орешков, был описан Ван Тигемом в 1867 г. Танназу образуют многие грибы, особенно связанные тем или иным образом с богатыми дубильными веществами широколиственными породами деревьев. Но наиболее активен среди ее продуцентов *A. niger*. Это адаптивный фермент, образующийся в присутствии в среде таннина или галловой кислоты. Однако дополнительная добавка в среду до 10% сахара не только не снижает активности этого фермента, но и направляет деятельность гриба исключительно на гидролиз таннина, предохраняя от дальнейшего потребления им образующуюся галловую кислоту (Фостер, 1950).

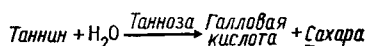
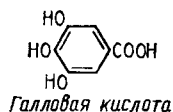


Рис. 6.12. Формула галловой кислоты и реакция гидролиза таннина танназой

Ферменты, расщепляющие таннин и фенолы, часто встречаются у грибов, паразитирующих на древесных растениях. К их числу относится паразит, встречающийся на коре деревьев, *Endothia parasitica*, поражающий их корни *Trametes radiciperda* (*Fomitopsis annosa*), и паразит, обитающий на хвое, *Herpotrichia nigra*. Изученная достаточно подробно *Endothia parasitica* продуцирует два фермента: 1) эстеразу, расщепляющую эфиры галловой кислоты и таннины, 2) пирогаллазу, фермент типа оксидаз, разрушающий галловую кислоту и гидрохинон. Ингибиторами этих ферментов оказались 10%-й раствор глюкозы и гидрохинон. Наличие у паразитных грибов ферментов этого типа приводит к тому, что многие растения, богатые токсическими для грибов дубильными веществами, оказываются неустойчивыми к таким патогенам.

Эстераза, сходно с танназой расщепляющая глюкозиды, была обнаружена у гриба *Coniothyrium diplodiella* и получила название нарингиназы, исходя из ее способности расщеплять нарингин, глюкозид, содержащийся в оболочках плодов цитрусовых и обуславливающий горький вкус сока грейпфрута. Этот фермент, который мог бы найти применение для улучшения вкуса соков цитрусовых, оптимально активен при pH 4,2 и при 60–65°C. При 70°C он инактивируется в течение 30 мин, но относительно стабилен при обычных температурах в пределах pH от 4,0 до 6,0. Как и действие танназы паразитных грибов, его активность ингибируется в присутствии в среде сахаров.

Протеолитические и фибринолитические ферменты. К числу гидролаз относятся также протеолитические ферменты грибов, которыми они снабжены весьма обильно (Андеркофлер, 1963а), так как они способны широко использовать для питания разнообразные белки и пептиды. Гидролизующие белки ферменты относят к категории протеиназ, гидролизующие пептиды — к категории пеп-

тидаз. Отличие пептидаз от протеиназ состоит в их способности отщеплять только концевые остатки аминокислот, в результате чего продуктами гидролиза оказываются только аминокислоты, но не пептиды, как в случае протеиназ. Различаются эти ферменты также и по оптимальным для их действия уровням pH: различают ферменты типа пепсинов, активные в кислых диапазонах pH, и типа трипсинов, связанные с более щелочными условиями среды. В наличии протеолитических ферментов у грибов можно убедиться при анализе результатов их изучения в мицелии *Penicillium chrysogenum*, получаемом при ферментации пенициллина (Маттисон, 1956), и *Aspergillus oryzae*, выращиваемом с целью получения комплекса амилолитических и протеолитических ферментов для применения их в пищевой промышленности (Авиженис, Савицкайте, 1969). Более подробный анализ показал, что в этот комплекс входят следующие энзимы: 1) протеиназы с оптимальной активностью при pH 5,0—6,5, расщепляющие альбумин и казеин; 2) пептидаза типа триптаз, отщепляющая концевые аминокислоты при pH 7,0—7,5; 3) пептидаза, проявляющая активность при pH 8,0—8,4. Две последние расщепляют желатину и пептон (Маттисон, 1956). Все эти ферменты способны пептонизировать коллаген кожи.

В препарате из мицелия *Aspergillus oryzae*, оризине ПК, с помощью разделения на сефадексе G-100 были обнаружены три фракции протеаз, а при разделении на сефадексе А-50 — пять фракций (Авиженис, Савицкайте, 1969), которые различались по их действию на казеин, гемоглобин и синтетические субстраты. Судя по данным дискового электрофореза, они были составлены различными белками. Среди них были обнаружены два энзима с оптимальной активностью в кислом (pH 4,5 и 5,0) и два — в щелочном диапазоне (pH 7,0 и 10,0), и они различно реагировали на соли Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} . Кислые протеазы теряли активность в присутствии детергента, ЭДТА и цистеина. Другие разнообразные грибы при их изучении также обнаруживали протеолитическую активность, например корневая губка *Fomitopsis annosus*.

К протеолитическим ферментам близки по свойствам кератинолитические, объединяемые под названием кератиназы, способные гидролизовать кератин шерсти, рога, волос и перьев. Отличие их от протеолитических энзимов состоит в том, что они, вероятно, способны энергично воздействовать на дисульфидные спайки, особенно многочисленные в кератине.

Кератинофильные грибы довольно часто выделяются из некоторых почв (Шатин, 1964), и среди них встречаются как типичные дерматофиты, например *Microsporium gypseum* и *M. cookei*, так и сапротрофы вроде *Keratinomyces ajelloi*. Сюда же, видимо, относятся встречающиеся нередко в почвах горных пастбищ Средней Азии виды *Sporotrichum*. Кератинолитической способностью обладают патогенные для человека и животных дерматофиты, а также обнаруживающийся на шерстепрядильных фабриках в обстановке

высокой влажности *Myrothecium verrucaria*, являющийся разрушителем шерсти в условиях производства. Механизм действия и свойства ферментов этой категории пока, видимо, недостаточно изучены.

Одну из важнейших категорий протеолитической группы энзимов в связи с их медицинским значением представляют собой *фибринолитические* энзимы. Фибринолитические ферменты грибов еще в 60-х годах привлекли внимание исследователей ввиду возможности их применения для консервативного лечения тромбозов и других заболеваний, связанных со свертыванием крови. По своей природе и типу действия эти ферменты близки к трипсину и к другим ферментам типа протеиназ, но многие из них, обладая слабой казеинолитической способностью, высокоактивны в отношении гидролиза фибрина, а некоторые одновременно стимулируют активность фибринолитических систем крови. К последним относятся стрептокиназа, получаемая из *Streptococcus haemolyticus*, и трихолизин — из гриба *Trichothecium roseum*, тогда как обладающие фибринолитическим действием, но неизвестные как активаторы фибринолиза в организме животного энзима выделялись преимущественно из видов рода *Aspergillus*.

Идея использования ферментов грибов для ликвидации тромбов и эмболий, по-видимому, принадлежит Стефанини, получившему первый инъекционный препарат этого типа «Аспергиллин О» из *Aspergillus oryzae*, представляющий собой нейтральный белок, осаждающийся солями тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}). Сходный препарат из штамма того же вида гриба был получен в Советском Союзе (Кудряшов и др., 1963; Егоров, Ландау, 1965). Термолабильный препарат из *A. oryzae*, названный аспергиллином (Струкова, 1965), отличался от выделенной из него несколько ранее аспергиллопептидазы В по оптимальному значению pH, типу действия, молекулярной массе и аминокислотному составу. Еще сильнее отличалась от них аспергиллопептидаза А, выделенная из *Aspergillus saitoi*, оптимально действующая в сильноокислой зоне (pH 2,5—3,0), и способная активировать трипсиноген и химотрипсиноген. Ее субстратная специфичность была шире трипсина, и она представляла собой одноцепочечную структуру с С-концевой группой серина и С-концевой группой аланина с дисульфидной связью. Кроме названных из числа фибринолитических ферментов видов рода *Aspergillus*, относительно хорошо изученных, необходимо отметить террилитин из *A. terricola* (Имшенецкий и др., 1965; Имшенецкий, Брокская, 1967; Самсонов и др., 1972) и браназу из *A. ochraceus*. Оба этих фермента очень сходны по молекулярной массе и аминокислотному составу и характеру их действия на фибрин и другие белки, но отличаются по оптимальному для их активности pH и их изоэлектрической точке. Из выявленных спектрофотометрически по пикам поглощения двух компонентов террилитина (Коршунов, 1965, 1969) основной компонент (с оптимальной активностью при pH 8,0—10,0) представляет собой нейтральную протеазу, активируемую солями Cu^{2+} и

Zn^{2+} в концентрации 10^{-2} , с небольшой примесью кислот (оптимальный pH 5,0) (Самсонов и др., 1972). Браназа, очищенная с помощью хроматографии на DEAE-сефадексе (Töpfer, Pischer, 1974), имеет оптимальный уровень pH 7,8—8,0, активируется и стабилизируется ионом Ca^{2+} (Roschbau, Ives, 1974).

Близкий к этим ферментам по молекулярной массе трихолизин из *Trichothecium roseum* сильно отличается от них по аминокислотному составу и типу действия, сходному с действием стрептокиназы. Помимо фибринолитической способности он активирует *in vitro* и *in vivo* плазминоген крови (Андреев и др., 1968; Andreenko et al., 1974). Трихолизин представляет собой сложный комплекс, содержащий свыше пяти активных компонентов. Контроль с помощью электрофореза в полиакриламидном геле выявил после разделения изоэлектрофокусированием только одну индивидуальную нейтральную фракцию IV с оптимальным для активности pH в пределах между 8,5 и 9,0, которая была изучена наиболее подробно, почти лишенную казеннолитической активности, но с высоким фибринолитическим и активирующим плазминоген эффектом. Все остальные фракции с ИЭТ от 3,7 до 10,0 также были способны к фибринолизу, хотя и с большей примесью казеннолитического действия, и содержали по 2—3 компонента, но оптимальное pH лежало для всех в одном диапазоне от 8,0 до 9,0 (Степанова, 1977).

Довольно глубоко изученным оказался также протеолитический и фибринолитический фермент из *Torula thermophila* с оптимальным для его активности pH в нейтральной и щелочной зоне и концевой группой глицина (Караваева, Мухитдинова, 1976; Мухитдинова, Караваева, 1976). Фибринолитическая и протеолитическая активность была также найдена у ферментов двух видов рода *Penicillium* пептидазы А из *P. janthinellum* с молекулярной массой 32 000 и оптимальной активностью при pH 3,0—4,0 (Hoffman, Sham, 1964; Shaw, 1964) и термолабильной протеазы из *P. lilacinum* с фибринолитическим эффектом в широком диапазоне pH от 4,0 до 11,0, являющейся комплексом металлоэнзимов с различной молекулярной массой (Андреева и др., 1972, 1973; Егоров и др., 1972).

Способность активно продуцировать протеолитические ферменты у грибов очень развита, что можно видеть из исследований (Егоров и др., 1971; Прудлов и др., 1972), в которых была обнаружена эта активность у 48 штаммов из полученных 59 (около 81%), относящихся к родам *Cladosporium*, *Fusarium* и *Alternaria*. При этом протеазы из *Fusarium solani*, *F. graminearum*, *Alternaria geophila* и *Alternaria* sp. 62 представляли собой комплексы ферментов с фибринолитической и тромболитической активностью в нейтральной и щелочной зонах pH (Егоров и др., 1972).

Из приведенного здесь перечисления можно видеть, что микромицеты являются очень перспективными источниками фибринолитических ферментов для применения в медицине. Они слабо токсичны и многие из них (трихолизин, террилитин, браназа и

аспергиллин) проходят в настоящее время клинические испытания, а «Аспергиллин О» давно уже является промышленным препаратом, применяемым в медицине США.

3. Окислительно-восстановительные ферменты и дыхательные цепи грибов

Реакции, производимые большинством из окислительно-восстановительных ферментов, являются крайне необходимыми для основного обмена грибов, поскольку они участвуют как в получении необходимой для синтетических процессов энергии, так и в подготовке исходных субстратов для этих синтезов, например, в форме восстановления нитратов или сульфатов. Вследствие их интимного участия в построении клеток они чаще бывают эндоэнзимами и имеются у всех грибов.

Окислительные ферменты делятся на: 1) дегидрогеназы, действующие по пути, установленному Виландом с отнятием от субстрата водорода, и 2) оксидазы, действующие, согласно теории Варбурга, через присоединение к субстрату кислорода. Однако это различие нельзя считать принципиальным, поскольку существуют дегидрогеназы, связывающие кислород, а роль большинства оксидаз сводится только к переносу электронов путем изменения валентности входящего в их состав металла. Кроме того, большинство из этих ферментов в восстановленном состоянии действуют как редуктазы (оксидоредуктазы).

Дегидрогеназы в большинстве случаев имеют в качестве коферментов или простетических групп никотинамид или флавины в форме НАД, НАДФ, ФМН или ФАД. В случае НАД-дегидрогеназ вторым кофактором большей частью бывает Zn^{2+} , а вторым компонентом органической простетической группы — аденин, как в никотинадениндинуклеотиде. Аденин является также вторым компонентом флавинадениндинуклеотида.

Наилучшим образом изучены дегидрогеназы дрожжей и некоторых плесневых грибов, в особенности *Aspergillus niger*. Триозофосфатдегидрогеназы дрожжей и *A. niger* обычно содержат в качестве второго кофактора Zn^{2+} , например, представляющая собой однокомпонентный белок глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, алкоголь — дегидрогеназа, фосфофруктокиназа и ряд других дегидрогеназ, участвующих в гликолитических путях ЭМП и ГМФ, как альдолаза и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (Bertrand, de Wolf, 1958; Wacker et al., 1958). Необходимость цинка для действия этих ферментов доказывается подавлением активности фермента 1:10 фенантролином. При присоединении двух молекул ингибитора к одному атому Zn^{2+} фермент инактивируется необратимо. В алкогольдегидрогеназе одна молекула ферментного белка комбинируется с четырьмя атомами цинка. Содержащие цинк дегидрогеназы подавляются многими факторами, например, фенантролин связывает цинк, Р-хлормеркурбензоат и Ag^{2+} — активные SH-группы, мочевины — ферментный белок.

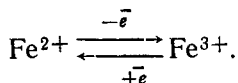
Участие в действии таких ферментов в качестве кофакторов НАД и НАДФ было доказано также с помощью гистохимических методов, основанных на образовании формазана из нитросинего тетразолия при инкубации с НАД или НАДФ и с соответствующим субстратом дрожжевых грибов *Paracoccidioides brasiliensis* и *Saccharomyces cerevisiae* (Reiss, 1967). В случае *Saccharomyces cerevisiae* исследовалось этим способом наличие НАДФ-пиридоксинфосфатдегидрогеназы, трансформирующей пиридоксинфосфат в пиридоксальфосфат. При этом помимо установления специфичности этой реакции путем подтверждения эффективности действия всех обнаруженных биохимическими методами ингибиторов (хлормеркурбензоат и антагонист пиридоксина 4-деоксипиридоксин-НСl) было отмечено отсутствие связи этого фермента с митохондриями. С помощью введения акцепторов электронов (дихлорфенолиндифенола или трифенилтетразолиумхлорида, ТТХ) было установлено наличие двух энзимов — НАДН₂-дегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы у базидиомицета *Oudemansiella mucida*, причем дегидрогеназа НАДН₂ оказалась промежуточным переносчиком электронов в дыхательной цепи этого гриба. В случае окисления исходных субстратов с гидрофобными свойствами часто роль промежуточного переносчика переходит к НАДФН₂-дегидрогеназе, для формирования которой необходимо присутствие фосфорилирующего НАД-энзима; НАД-киназы. Именно с формирования этого фермента начинается прорастание конидий *Neurospora crassa*, и максимум его накопления достигается уже через 30 мин от начала их инкубации в воде (Афанасьева и др., 1982).

В начале интенсивного вегетативного роста гриба, при потреблении углеводов, активность НАД-киназы сильно падает и снова нарастает при спаде интенсивности роста через сутки инкубации. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле было обнаружено, что НАД-киназа у *N. crassa* присутствует в четырех формах субъединиц с разной молекулярной массой, из которых наиболее высокомолекулярные (I и II) характерны для конидий, а III форма с меньшей в 11,2 раза молекулярной массой преобладает в вегетативном мицелии (Афанасьева и др., 1982).

Дегидрогеназа, содержащая флавины, в частности глюкозооксидаза (β -D-глюкоза: О₂-оксидоредуктаза), содержащая ФАД, была впервые обнаружена Мюллером в отпрессованном соке из *Aspergillus niger* еще в 1926 г. В дальнейшем она была установлена у *A. oryzae*, *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum*, дрожжей и ряда других грибов (Андеркофлер, 1963б). Этот фермент, окисляющий глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконат, наряду с 6-фосфоглюконатдегидрогеназой был найден также у различных видов *Phytophthora* (Clare, Zentneyer, 1966). Из других дегидрогеназ в прорастающих спорах *Puccinia recondita* обнаружена дегидрогеназа яблочной кислоты (Masko, Novacky, 1966), а в спорах грибов-трутовиков *Trametes versicolor* и *Phellinus igniarius* — флавин-содержащая ксилосооксидаза. К числу флавиновых дегидрогеназ относится также сукцинатдегидрогеназа. Участие флавиновой си-

стемы в дыхательной цепи было также обнаружено у базидиомицета *Oudemansiella mucida*, а флавиносодержащие галактозооксидаза и глюкозооксидаза у *Polystictus circinatus*. Флавиновые энзимы *O. mucida* типа глюкозо-2-оксидазы оказались способными окислять моносахариды в соответствующие им гексозулозы, например D-арабино-2-гексозулозу (Vole et al., 1978, 1980).

Оксидазы не все способны самоокисляться с присоединением кислорода, как это должно быть исходя из теории Варбурга. Ферменты этого типа скорее можно обобщить, исходя из структуры их простетических групп, которые в подавляющем большинстве случаев представляют собой порфирины со строением гема, составленного из четырех пиррольных фрагментов (рис. 6.13). Азотные компоненты гема способны высвобождать валентности, могущие удерживать в центре этой структуры какой-либо металл. Примером типа такой структуры может служить строение протопорфина IX (рис. 6.14). Наиболее типичны среди них цитохромы, содержащие железо, осуществляющее реакцию переноса электронов типа



Биосинтез порфиринов (рис. 6.15) исходит из глицина и сукцинилкоэнзимаА, причем при декарбоксилировании и отнятии воды на первом этапе получается 8-аминолевулиновая кислота. При дальнейшей циклизации получается порфобилиноген, из четырех фрагментов которого формируется уропорфиринIII. Четвертый этап биосинтеза состоит в потере уропорфириномIII четырех молекул CO_2 с трансформацией его в копропорфириногенIII, который, теряя еще две молекулы CO_2 и окисляясь, превращается в протопорфириногенIX. Дальнейшее его окисление с потерей четырех атомов водорода приводит к образованию протопорфинаIX.

У головневых грибов в синтезе цитохромов, видимо, принимает участие цинк, что видно на примере *Ustilago sphaerogena*, резко повышающего продукцию цитохрома в присутствии повышенных доз цинка. То, что цинк участвует при этом в синтезе белкового компонента энзима, можно видеть из результатов внесения одновременно с цинком специфического ингибитора и-РНК актиномицина D, который полностью подавляет синтез цитохрома у *Ustilago sphaerogena* (Brown et al., 1966). Наиболее подробно цитохромы изучались у дрожжей, однако с помощью спектрофотометрии они также были обнаружены у очень большого ряда гифообразующих грибов из всех классов (Lindenmayer, 1965).

В настоящее время у грибов известно восемь видов оксидаз со строением цитохромов, относящихся к трем из четырех известных типов структур этих ферментов. У них встречаются цитохромы *a*, *a*₁, *a*₃, *b*, *b*₁, *b*₂, *c* и *c*₁. Не обнаружен у грибов только встречающийся у бактерий цитохром типа *d*.

Большая часть этих энзимов участвует в переносе электронов в дыхательной цепи, и только два из них (a_1 и b_1) образуются в анаэробных условиях. Цитохром b_2 отличается от всех других цитохромов тем, что он постоянно связан с ДНК, состоящей из 30 нуклеотидов, потеря которой, однако же, не влияет на активность фермента. Функции этого цитохрома состоят в специфическом окислении лактата и других оксикислот.

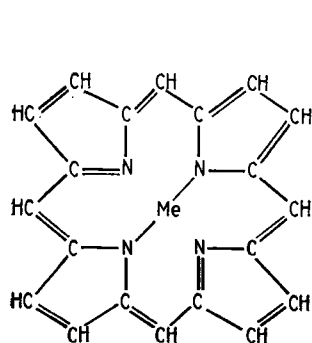


Рис. 6.13

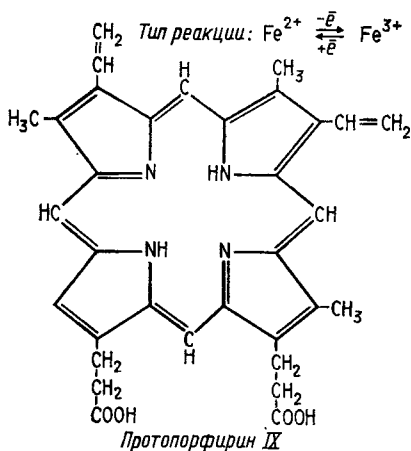


Рис. 6.14

Рис. 6.13. Структура порфиринового ядра; Me — металл

Рис. 6.14. Структура протопорфина IX и тип реакции гемовых ферментов

У грибов известен также не вошедший в сводку Линденмейера цитохром P-450, окисляющий алканы и другие липиды через монооксигеназную микросомальную систему, содержащую кроме цитохрома P-450 еще НАДФН₂, цитохром P-450-редуктазу и фосфолипидный компонент (Мауэрсбергер, Матяшова, 1980). Она формируется при росте на *n*-алканах как единственном источнике углерода и энергии у *Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Torulopsis candida*, участвуя в окислении алканов и жирных кислот. При достижении стадии торможения роста дрожжей концентрация цитохрома P-450 в их клетках значительно снижается. Этот фермент является адаптивным, специфически формирующимся при росте дрожжей на средах с гексадеканом, пальмитиновой кислотой или при использовании эндогенных липидов после истощения источника углерода при росте на среде с глюкозой (Ильченко и др., 1980), что было установлено при исследовании культур *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. guilliermondii* и *Torulopsis candida*. Оксигеназная система, включающая цитохром P-450 и

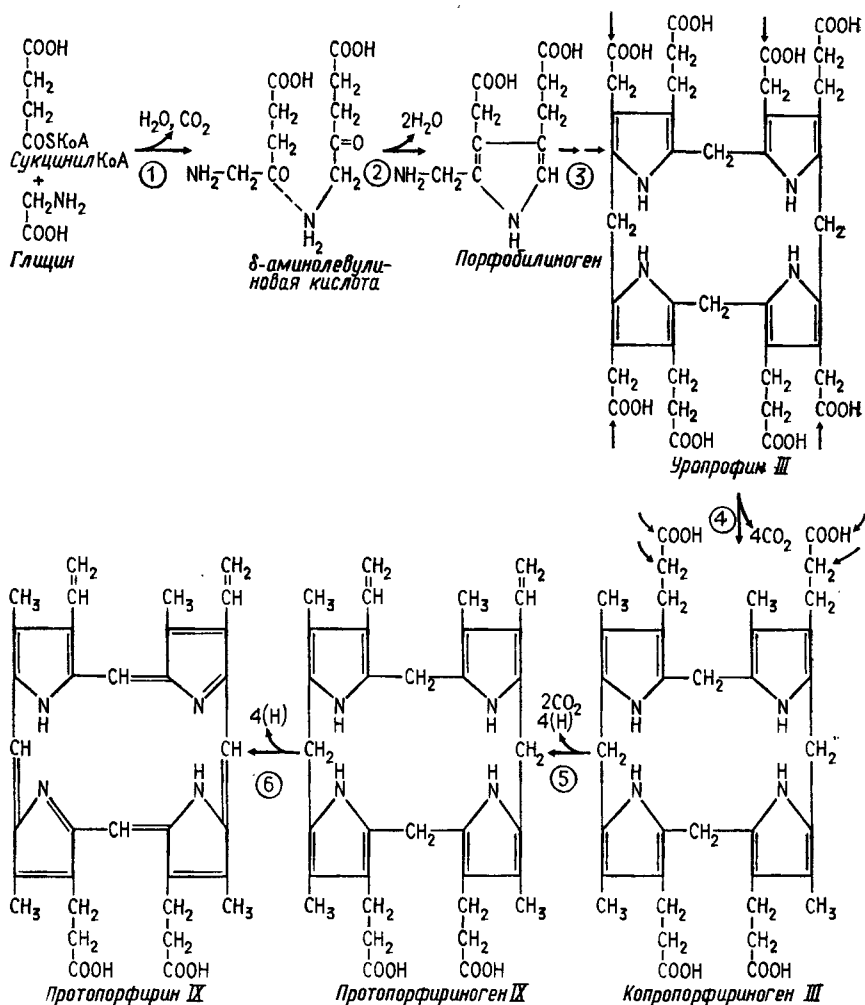


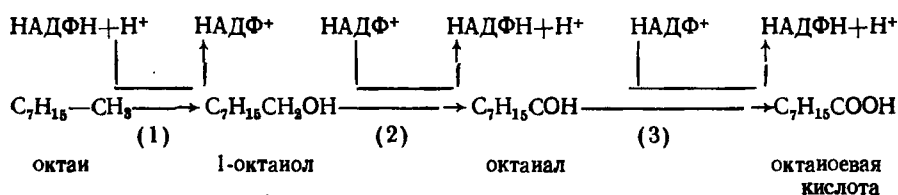
Рис. 6.15. Биосинтез порфиринов (Девис и др., 1966)

НАДФН, подавляется оксидом углерода (II), но является цианид-резистентной и нуждается в наличии молекулярного кислорода, предпочтительнее использует алканы со средней длиной цепи, окисляя их сначала в соответствующие спирты (и гидроксипроизводные) и альдегиды, а потом в жирные кислоты (Weete, 1980). Пигмент гемопротеин Р-450 был впервые открыт у *Saccharomyces cerevisiae* в корпускулярной фракции гомогената его клеток.

Путь окисления алканов при посредстве цитохрома Р-450 показан в табл. 6.8. Субстратспецифичные оксигеназы грибов, функ-

Таблица 6.8

Схема окисления *n*-октана *Candida lipolytica* при участии цитохрома Р-450 (Weete, 1980)



(1) — *n*-октангидроксилаза; (2) — 1-октаноолдегидрогеназа; (3) — октанальдегидрогеназа.

ционирующие с помощью цитохрома Р-450, изучались в течение последнего десятилетия довольно интенсивно как в целях использования грибов для переработки различного типа углеводов, так и в целях трансформации стероидов при изготовлении лечебных препаратов типа кортизона. Одним из ранних исследований этой категории было обнаружение у *Aspergillus niger* железозависимой антранилатгидроксилазы, производящей двойное гидроксирование антраниловой кислоты, но теряющей эту активность при росте гриба на среде с дефицитом железа или в присутствии *o*-фенантролина. Фермент реактивировался в присутствии ферриэтилендиаминтетрауксусной кислоты (Fe²⁺-ЭДТА) или феррицитрата (Kumar et al., 1973). Позднее у гриба *Acremonium* sp. была обнаружена НАДФН-зависимая оксигеназа сходного типа, окисляющая этан сначала до этанола, а потом до ацетальдегида и соответствующей кислоты (Davies et al., 1976). Сходство этой оксигеназы с оксигеназой на основе цитохрома Р-450 состояло в том, что в бесклеточном гомогенате она оказалась связанной с фракцией микросом. Однако испытание ее СО-спектра поглощения не дало характерных для цитохрома Р-450 результатов.

Способность производить гидроксирование ароматических углеводов свойственна муковому грибу *Cunninghamella bainieri*, причем связанный с этим окислением фермент содержит цитохром Р-450. Фермент НАДФН-зависимый, теряет активность

в присутствии типичных для Р-450 ингибиторов (СО, SKF-525А и метирапон), имеет оптимальный рН 7,8 и обладает цианидрезистентностью. Кроме того, он связан с микросомной фракцией и его принадлежность к оксигеназам на основе цитохрома Р-450 подтвердилась его отношением к металлам (например, подавление активности Fe^{3+} и стимуляция ее Fe^{2+} /Ferris et al., 1976).

Гидроксילирование с помощью грибов стероидов и другие их трансформации, например, связанные с формированием двойных связей в кольце, также производились, причем преимущественно с применением грибов из числа дейтеромицетов. Способен производить эти трансформации и ряд базидиальных грибов, например, гидроксילирование в положениях 2- β , 7- α , 7- β , 11- α , а также восстановление кетоформ в позициях 20- β в гидроксильную форму. Производить трансформации 3- β -гидрокси-5-андростен-17-она оказался способным базидиальный гриб-дереворазрушитель *Pleurotus ostreatus* (Thoa et al., 1978). Некоторые виды грибов способны производить и обратные реакции, приводящие к восстановлению окисленных форм гидроксисоединений. Такая реакция, производимая гидроксипируватредуктазой, была обнаружена у *Aspergillus niger*.

Уже давно было установлено, что цитохромная дыхательная цепь грибов, исключая микросомальные оксигеназы, связанные с цитохромом Р-450, находится в митохондриях. Первоначальные исследования цитохромов грибов проводились спектроскопически на неразрушенном мицелии или на нефракционированном его гомогенате. Из исследованных 45 видов грибов все содержали цитохромы типов *a*, *b* и *c* и цитохромоксидазу (a_3), хотя некоторые из них показывали отличия друг от друга в деталях спектров поглощения.

Позднее исследовалась фракция отмытых при центрифугировании при $10\,000\times g$ митохондрий базидиомицета *Schizophyllum commune*, как нативных, так и в присутствии различных ингибиторов (Niederpruem, Hachett, 1961). Дыхание митохондрий ингибировалось соответственно 97, 95 и 85%-м фенолмеркурацетатом, антимицином А, блокирующим дыхательную цепь на уровне перехода между цитохромом *b* и *c* и блокирующими цитохром a_3 цианидом и азидом, а также высокими концентрациями (порядка 10^{-3} — 10^{-4}) динитрофенола, разобщающего окисление с фосфорилированием. Митохондрии *S. commune* окисляли НАДН особенно в присутствии цитохрома *c*, восстанавливающегося при включении в систему цианида. Этими и другими тестами было показано наличие в митохондриях цитохромов *b*, *c* и a — a_3 , подтверждаемое не только подавлением системы цианидом, но и реакцией подавления дыхания в темноте оксидом углерода (II). В митохондриях *S. commune* выявлены также сукцинатцитохром *c* редуктазная, цитохром *c*, НАДН- и сукцинатоксидазная и цитохром *a* оксидазная системы. Расчет на основе спектрофотометрических измерений показал четко эквивалентные концентрации в митохондриях *a*, *b* и *c* типов цитохромов.

Исследовался также дифференциальный спектр (при -196°C) фракции митохондрий *Agaricus campestris* var. *bispora* (Gallinet, 1974, 1976), показавший, что в них содержатся цитохромы $a-a_3$ и, по-видимому, не менее трех цитохромов с пиками поглощения при 552, 557 и 562 нм, а также цитохромы c и c_1 . Соотношения цитохромов типов a , b и c были равны 1,0 : 1,5 : 2,0 соответственно. Сопоставление этих данных с соответственными расчетами для других видов грибов показывает близкие соотношения цитохромов только у *Aspergillus niger*, тогда как у дрожжей *Saccharomyces carlsbergiensis* и *Neurospora* они увеличиваются для цитохромов b и c более прогрессивно (табл. 6.9).

Таблица 6.9

Подсчет концентраций трех типов цитохромов, определяющих их стехиометрию у разных видов грибов (Gallinet, 1974), нмоль/мг белка

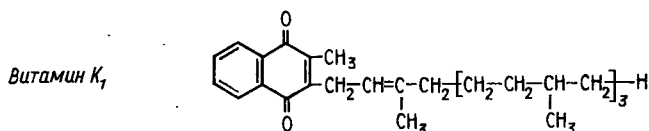
Цитохромы	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces carlsbergiensis</i>	<i>Neurospora crassa</i>
a	0,22 (1,0)	0,15 (1,0)	0,15 (1,0)	0,24 (1,0)
b	0,32 (1,5)	0,19 (1,3)	0,28 (1,9)	0,66 (2,8)
c	0,44 (2,0)	0,39 (2,6)	0,65 (4,3)	1,32 (5,6)

Исследование кинетики восстановления цитохромов *Agaricus campestris* показало, что у него присутствуют только два цитохрома типа b , которые восстанавливаются в присутствии сукцината, с пиками поглощения при 559 и 562 нм, обнаруживаемые при температуре жидкого азота (-196°C).

Цепь переноса водорода (или электронов), т. е. дыхательная цепь в полном ее виде, включает еще и другие компоненты, а именно ферредоксины и коэнзим Q. Ферредоксины или железосеропротейны мало изучены в отношении их структуры. Известно, что они включаются в митохондриальный перенос электронов в тесном сочетании с флавиновыми ферментами в процессе их контакта с пиридиновыми дегидрогеназами. В их составе имеется различное количество (от двух до семи атомов) негемового железа и такое же количество лабильных сульфгидрильных групп, освобождающихся в виде H_2S при подкислении. Подробнее изучены ферредоксины — участвующий в фотосинтезе хлоропластов шпината и в усвоении атмосферного азота, выделенный из анаэробного микроба *Clostridium pasterianum* (Ленинджер, 1974), но считается, что они есть и у грибов (Lyg et al., 1975).

Коэнзим Q относится к числу хинонов, формирующихся в шунте терпенов (рис. 6.16) и совершенно несходных по структуре с

Убихиноны различного строения обнаружены сейчас у значительного числа грибов, как дрожжевых, так и гифообразующих из классов сумчатых, базидиальных и несовершенных грибов (Lin-



дептауер, 1965). Образуются они как в анаэробных, так и в аэробных условиях, и установлено их место в дыхательной цепи между флавинами в сочетании с ферредоксинами и цитохромом *b* (Ленинджер, 1974).

183

Параллельно существует также система, начинающаяся с флавиновой сукцинатдегидрогеназы (кофермент ФАД), субстрат сукцинил-КоА, переносящая электроны прямо на убихинон. Сходный процесс претерпевают продукты распада жиров — глицерофосфат и ацилированные КоА производные жирных кислот (рис. 6.18). Путь переноса электронов через НАД возможен с изоцитрата, малата и пирувата, также с глутамата и различных 3-оксиацилпроизводных КоА. На трех этапах дыхательной цепи может происходить сопряжение окисления с фосфорилированием (образованием АТФ), а именно между ФМН и КоQ, цитохромами *b* и *c*, цитохромом *a* и кислородом воздуха, где это позволяет высокая разность энергетических потенциалов перехода коэнзимов (E_0').

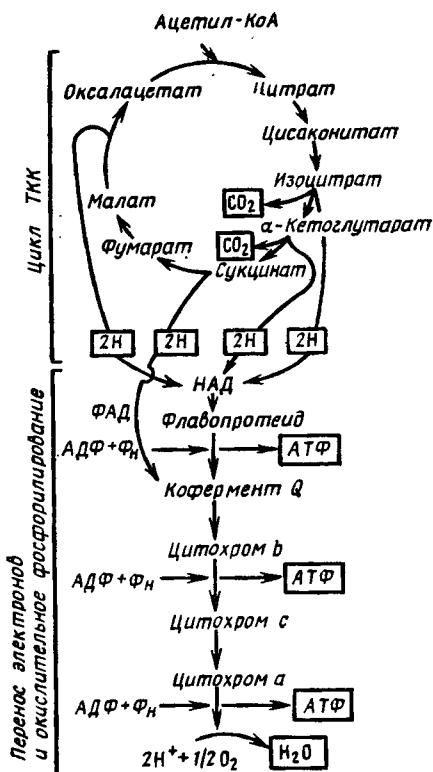


Рис. 6.17. Схема дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования. Конечные продукты стадий в рамке (Ленинджер, 1974)

(I), второй через сукцинат→флавинадениндинуклеотид (ФАД) и другой железосеропротеин (II) — оказались сходящимися. Место их соединения — это этап цепи переноса, занятый коэнзимом Q, с которого осуществляется передача заряда на цитохром.

Блокирование цианидом, оксидом углерода (II) или азидом этапа цитохрома *a* + цитохромоксидаза (цитохром a_3) приводит к прерыванию перехода от окисленного состояния к восстановленному и обратно всех компонентов цепочки цитохромов, что на модели клеток животных дает в результате полное прекращение дыхания. Однако у целого ряда нечувствительных к цианиду грибов дыхание при этом не прекращается, причем даже тогда, когда блокируется с помощью ротенона, дексона или амитала начальный

этап цепи I через НАД и ФМН. Блокировка антимицином А перехода от цитохрома *b* к цитохрому *c* может в этом случае привести даже к стимуляции дыхания. Полное прекращение дыхания дости-

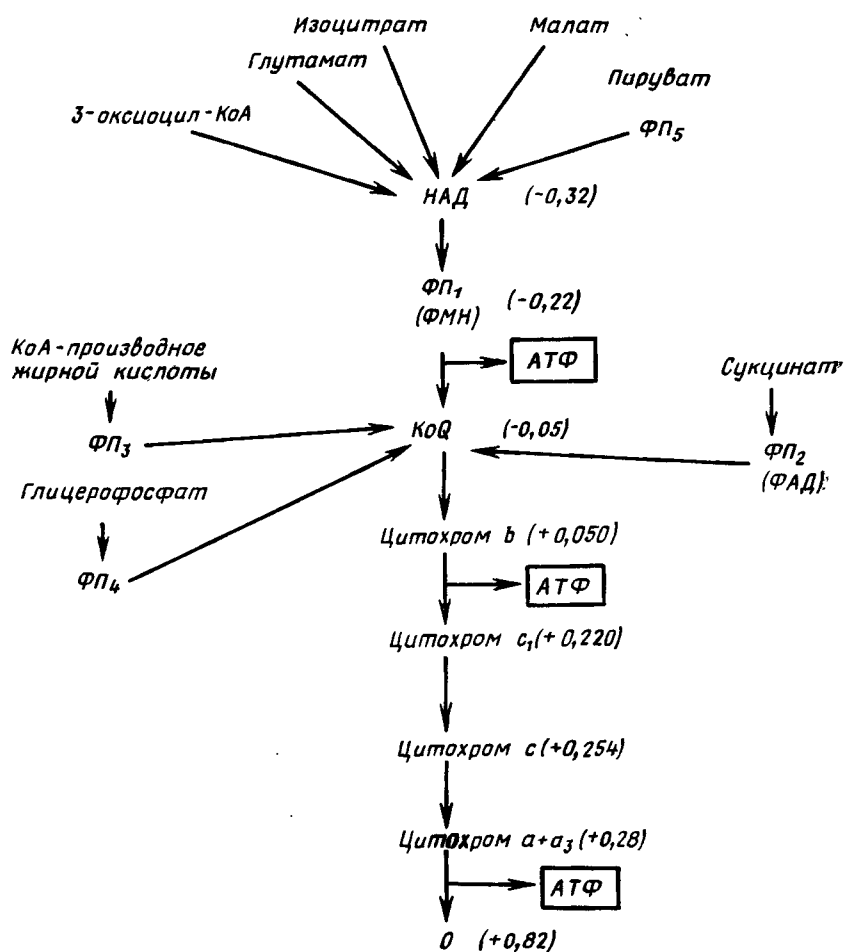


Рис. 6.18. Места вхождения электронов от различных субстратов в дыхательную цепь и места окислительного фосфорилирования: ФП — флавопротеины; в скобках уровни E_0 , V (Леннджер, 1974)

гается только при одновременном с цитохромами блокировании карбоксином, теонилтрифторацетатом (ТТФА) или 8-оксихинолином этапов пути II через сукцинат, ФАД и железосеропротеин. При блоке одних этапов цитохромов дыхание значительно усиливается, не уступая нормальному в контроле (Lug et al., 1975). Это

прямо указывает на наличие альтернативного пути дыхания с усвоением кислорода через иные, чем цитохромы, пока еще не изученные акцепторы. Заблокировать этот путь можно только ма-

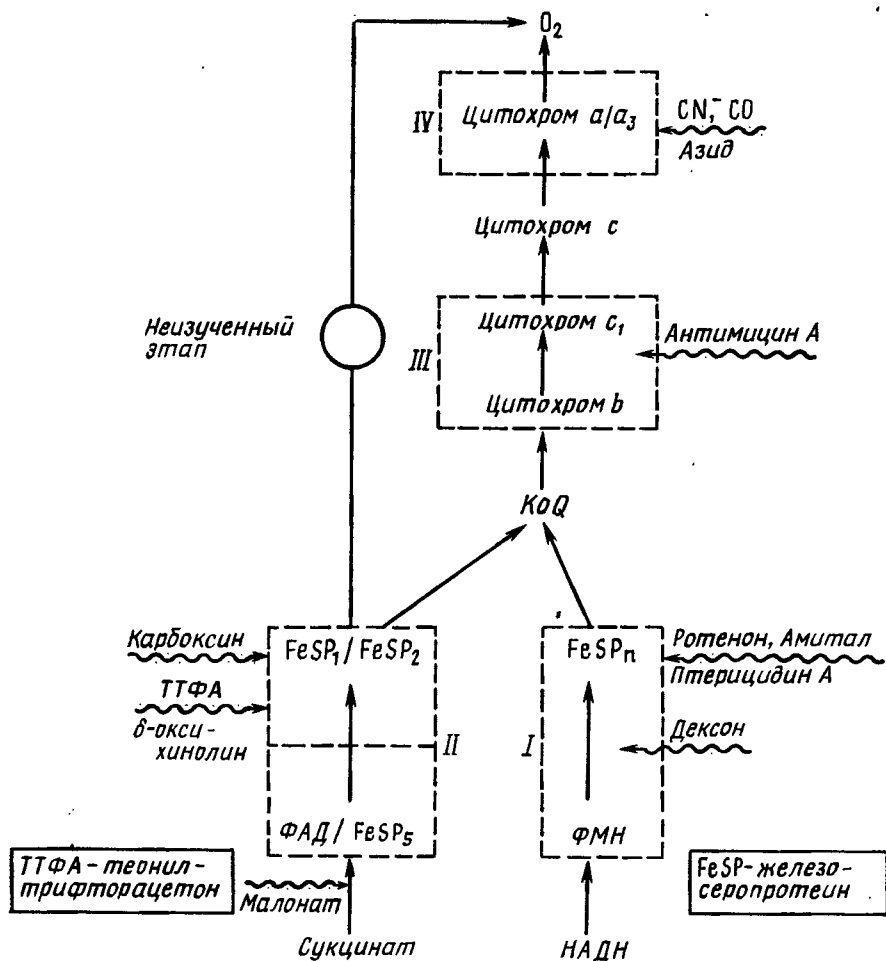


Рис. 6.19. Схема главной и альтернативной дыхательной цепи грибов и блокирующих различные этапы ингибиторов. Места действия ингибиторов указаны стрелками с волнистой чертой (Lyr et al., 1975)

лонатом или веществами, воздействующими на ферредоксиновый компонент цепи II, как карбоксин, 8-оксихинолин и ТТФА (см рис. 6.19).

На следующем этапе этого альтернативного пути могли бы, возможно, оказаться, например, меланины с их способностью к аутоокислению и восстановлению, хотя до настоящего времени их

окисление считается свободным, не связанным с способностью к фосфорилированию. Это в определенной степени поддерживается значительно меньшей потребностью меланинсодержащих форм в кислороде при их дыхании (Жданова, 1976) и цианидрезистентностью при чувствительности к блокаде цепи II окисления темноокрашенных грибов как *Trametes versicolor*, *Ustilago maydis*, виды аскомицетов из порядков *Helotiales* и *Sordariales* (Lyg et al., 1975). Исключение составляет краснопигментная, но цианидрезистентная *Rhodotorula mucilaginosa*.

Наличие у грибов альтернативных путей дыхания имеет принципиальное значение для отбора системных веществ, применяемых для борьбы с болезнями растений. Были проведены обширные эксперименты на дрожжевых грибах из родов *Torulopsis* и *Candida*, показавшие, что количество альтернативных путей переноса электронов в дыхательной цепи грибов, видимо, достигает значительного числа вариантов. Только у одного *Torulopsis candida*, по мнению исследователей, их намечается не меньше четырех (Ильченко, Соколов, 1980). Прежде всего были замечены различия в первых ступенях цепи переноса, заключающиеся в замене блокируемого цианидом обычного пути электронного транспорта цианидрезистентным, формирующимся при росте на нормальных алканах, сопровождаясь продукцией цитохрома Р-450, участвующего в их гидроксилировании до алканолов (рис. 6.20). При росте на глюкозе цитохром Р-450 не появлялся до ее полного исчерпания (Ильченко и др., 1980).

Метаболизм *n*-алканов (а также, видимо, ряда жирных кислот и липидов), как выяснилось из опытов с ингибиторами, протекает на базе микросомальной фракции цитоплазмы (Ильченко, Соколов, 1980) при участии НАДФ и цитохром-Р-450-редуктазы. Он ингибируется, сходно с подавлением ингибиторами микросомальной оксигеназы, СКФ-525А, метирапоном и бензогидроксамовой кислотой (БГК). Эта система была обнаружена кроме *Torylopsis candida* еще у трех видов *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. tropicalis* и *C. lipolytica*/Мауерсбергер, Матяшова, 1980), которые все были способны утилизировать для роста *n*-алканы, и отсутствовала у не растущих на этом субстрате видов.

Помимо этой системы, связанной с цианидрезистентным путем, блокируемым БГК (Ильченко, Соколов, 1989), по-видимому, имеется второй устойчивый к цианиду путь переноса электронов, где конечное окисление осуществляется за счет перекиси водорода при участии цитохром-с-пероксидазы. Схематическое изображение описанных путей переноса электронов у *Torulopsis candida* приведено на рис. 6.20.

Среди других альтернативных путей дыхания грибов известно наличие цианидрезистентного митохондриального пути окисления у гифообразующих грибов, например у *Moniliella tomentosa*. У этого гриба такое дыхание возникает под влиянием нормальных пропанола и бутанола, тогда как метанол и этанол не способны его индуцировать. Причина индукции цианидрезистентного дыхания

заключается в способности C_3 и C_4 алкоholes интерферировать с окислительным фосфорилированием, что приводит к снижению роста и накоплению этилового спирта (Venderleyden et al., 1978).

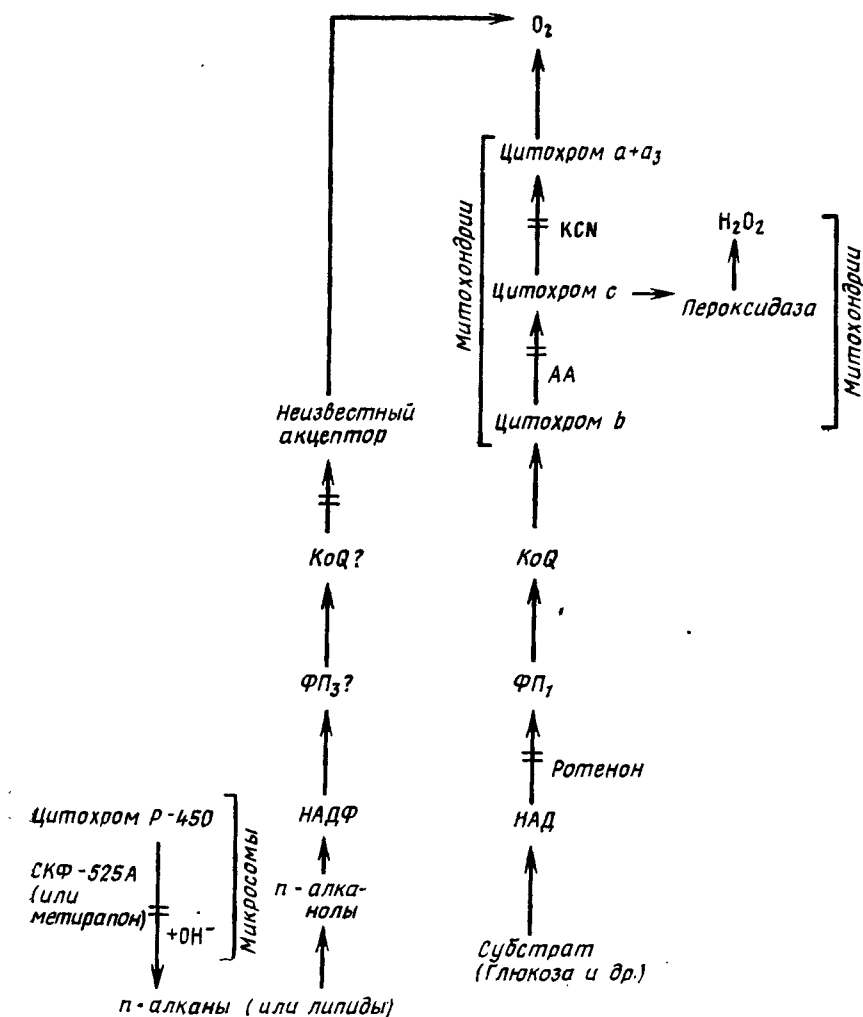


Рис. 6.20. Предположительная схема альтернативных путей переноса электронов у *Torulopsis candida* и других дрожжей из рода *Candida* в зависимости от состава среды и фазы роста: БГК — бензогидроксамовая кислота; АА — антимици А (Ильченко, Соколов, 1980)

Цианидрезистентность дыхания была также обнаружена у грибов *Fusarium sambucinum* (Акименко и др., 1981) и *Fusidium coccineum* (syn. *Acremonium fusidioides* Gams /, Телеснина и

др., 1980), изучавшихся в связи с образованием ими антибиотиков энниатина и фузидиевой кислоты. Эксперименты проводились на фоне исследования ингибиторов дыхания. У *Fusudium* энергообеспечение, способствующее росту биомассы, связано в основном с окислительным фосфорилированием, локализованным в митохондриях, и с дыхательной цепью с включением цитохромов. Введение ингибирующего синтез ферментов этой цепи хлорамфеникола переводило активного продуцента фузидиевой кислоты полностью на цианидрезистентный путь дыхания, и выход антибиотика на единицу биомассы повышался в три раза. Наоборот, при ингибировании цианидрезистентного дыхания салицилгидроксаматом он снижался в 4,5 раза. По этим данным, а также по нарастанию интенсивности цианидрезистентности от неактивных штаммов к обильно продуцирующим антибиотик (в конце ферментации от 15—16% до 90—100% от полной дыхательной активности) можно было вывести заключение, что синтез данного антибиотика тесно связан с ингибируемым гидроксаматами путем свободного окисления, возможно, ароматических веществ, в котором, например, формируются меланины.

В случае биосинтеза антибиотика рода *Fusarium*, энниатина, сходное исследование привело к несколько иным результатам (Акименко и др., 1981). Интенсивность синтеза энниатина связана с потреблением пула АТФ, которое более выражено в период усиленного роста и менее явно в стационарной фазе, в период наиболее активного синтеза антибиотика. Соответственно у активного продуцента переход в конце ферментации на цианидрезистентное дыхание был менее выражен, чем у неактивного. И то и другое говорит о более, чем в случае фузидиевой кислоты, интенсивной связи биосинтеза энниатина с энергетическим обменом и синтезом новых ферментных систем, в частности связанных с затратой энергии гидролиза АТФ.

Авторы указанной работы считают, что цианидрезистентное дыхание, так же как и сверхсинтез метаболитов (например, лимонной кислоты), является вариантом сброса избыточной свободной энергии в случае цианидрезистентного дыхания, протекающего на уровне коэнзима Q в дыхательной цепи. Однако скорее все же можно считать, что синтез лимонной кислоты (или например, этанола) нельзя причислять только к футильным («бесполезным») циклам, существующим исключительно для сброса лишней энергии, так как эти продукты легко используются в основном обмене. То же касается и близкой по структуре к стеролам и меланинам фузидиевой кислоты. Меланины, как и стеролы, помимо других функций используются в обмене, о чем говорит поддержка ими жизнедеятельности и синтезов, их окисление в процессе дыхания и включение в них не только кислорода, но и меченой изотопом углекислоты. Судя по согласованности эффекта гидроксаматов в отношении синтеза меланинов (Жданова, 1976) и цианидрезистентного дыхания (Телеснина и др., 1980; Акименко и др., 1981), их формирование должно идти именно при участии этого энерго-

дающего процесса на базе полифенолоксидаз. В пользу последней гипотезы в некоторой степени говорят также исследования группы авторов (Трутко и др., 1980) по влиянию на цианидрезистентное дыхание *Candida lipolytica* дефицита ряда микроэлементов.

Несмотря на сильное угнетающее влияние дефицита железа на синтез всех цитохромов (включая и цитохром с и его пероксидазу), цианидрезистентное дыхание не угнетается, а даже стимулируется при его дефиците у данного организма. Правда, ускорение появления цианидрезистентного пути в дыхательном метаболизме *C. lipolytica* наблюдается также и при дефиците меди, вследствие чего вопрос о возможной природе цианидрезистентных оксидаз этого организма остается пока в значительной мере открытым.

Полифенолоксидаза. К числу полифенолоксидаз, важных для некоторых путей окисления и формирования меланинов, ранее относили две категории: собственно полифенолоксидазы, или лакказы, окисляющие фенолы, и тирозиназу, окисляющую азотсодержащие соединения с бензольным кольцом, например тирозин или фенилаланин. Сейчас эти ферменты считают за единую группу. Ферменты этого типа, видимо, имеют строение гемов, однако в противоположность цитохромам в их состав входит не железо, а обычно закисная медь. Поэтому грибы, образующие обильно тирозиназу, нуждаются в повышенных дозах меди и могут иногда добывать ее из медьсодержащих фунгицидов. Железо и марганец могут выступать как конкуренты и ингибиторы лакказы.

Лакказой, окисляющей такие соединения, как перокатехин, гидрохинон, резорцин, бензидин и т. п. в соответствующие хиноны, обладает большинство грибов — дереворазрушающих базидиомицетов, например *Oudemansiella mucida*, *Polyporus versicolor*, *Polyporus zonatus*, *Collybia velutipes*, *Psalliotia bisporea*. У всех этих грибов лакказа выделяется в окружающую среду, почему они все дают реакцию Бавендамма на посинение введенной в среду гваяковой кислоты (Луг, 1958). Эта реакция отсутствует у возбудителей буровой гнили древесины, как *Coniophora cerebella* (*C. puteana*), *Lentinus squamosus* или *Daedalea quercina*. Их считали ранее неспособными образовывать полифенолоксидазы, однако в настоящее время выяснилось, что многие из них, в частности возбудители бурой гнили из родов *Polyporus* и *Coniophora*, имеют внутриклеточную полифенолоксидазу, которую они не способны выделять в окружающую среду. В частности, это касается *Coniophora puteana* (Rösch, 1966).

Среди грибов — возбудителей белой гнили — продуценты внеклеточной лакказы встречаются очень часто, а среди обследованных Люром 103 видов дереворазрушителей их оказалось 47% (Луг, Ziegler, 1959). Из *Polyporus versicolor* был получен и охарактеризован гомогенный препарат лакказы, которую он продуцирует очень обильно. Стимуляторами полифенолоксидазы оказались органические растворители, например 50%-й алкоголь, предположительно способствующий диссоциации требуемого для действия энзима компонента. Ингибиторами лакказы и, видимо, естествен-

ными ее регуляторами являются нуклеиновые кислоты, как РНК, так и ДНК, а также другие соединения пуринов. Предположительно они связывают входящую в состав фермента медь, а также и белковый компонент фермента. Лакказы *Polyporus versicolor* и *P. zonatus* оказалась эффективной в пределах pH от 3,0 до 6,5 с оптимумом действия при pH 5,0 и продукция ее специфически увеличивалась в 60 раз при введении в культуральную среду 33 мг/л йодида калия (Lindenberg, Fåhrgrens, 1952).

Функция внеклеточной лакказы дереворазрушающих грибов начала разъясняться на модели грибов — возбудителей белой гнили древесины — в связи с выявлением роли фенолоксидазной системы в разрушении лигнина, сопряженной с целлюлозоразрушающей способностью этих грибов. Оказалось, что активность целлюлаз при разложении древесины до конечного продукта, целлобиозы, тесно связана с образованием фенолоксидазами хинонов и феноксирадикалов через действие энзима целлобиозохиноноксидоредуктазы (Westermarck, Eriksson, 1974). Это было показано на примере такого вида гриба — возбудителя белой гнили древесины, как *Sporotrichum pulvirulentum*, являющегося несовершенной стадией базидиомицета *Phanerochaete chrysosporum*. Окислительно-восстановительная система этого гриба (типа лакказы) играет регулируемую роль в комплексных процессах разложения грибами лигнина и целлюлозы. Это было доказано тем, что мутант этого гриба с дефицитом фенолоксидазы оказался способным разрушать лигнин только при добавке в его культуру лакказы (Ander, Eriksson, 1976). Механизм этой регулирующей функции, изученный на примере гриба *Pleurotus ostreatus*, состоит, видимо, в том, что промежуточный продукт разложения целлюлозы — целлобиоза окисляется с помощью дегидрогеназ (целлобиозохиноноксидоредуктаз) с восстановлением хинона в феноксирадикал, возникающий при деградации лигнина, заканчивающейся полимеризацией феноксирадикала и образованием меланина. Таким образом, целлюлозоразрушающая и лигнинразрушающая способности грибов оказываются тесно взаимосвязанными и взаимно регулирующими друг друга (Hiroi, Eriksson, 1976).

Лакказа считалась неспособной окислять ароматические аминокислоты типа тирозина или фенилаланина. Эту способность приписывали другому, близкому к ней по свойствам ферменту — тирозиназе. Однако сейчас большей частью эти два фермента считают идентичными. Тирозиназа также содержит в качестве кофермента медь, что доказывается реактивацией ее ионами Cu^{2+} при подавлении синильной кислотой.

Тирозиназа, играющая большую роль в обмене животных при образовании дигидроксифенилаланина (ДОФА), предшественника гормонов надпочечников адреналина и норадреналина, очень распространена и у грибов микоризообразователей, таких как виды *Boletus* и *Lactarius*. Мякоти их плодовых тел свойственно синеть на изломе (у подосиновика, *Boletus luridus*, груздя, белянки и других видов *Lactarius*). Также синееет она у шампиньона.

Тирозиназа бывает как внеклеточной, выделяющейся в среду, так и внутриклеточной, причем последняя была обнаружена у ряда дереворазрушающих грибов, как *Polyporus schweinitzii* и *P. sulphureus* (Rösch, 1966). Роль ее у грибов, вероятно, в некоторых чертах сходна с ее ролью у животных, у которых продукты, образующиеся при действии тирозиназы (адреналин и норадреналин), принимают большое участие в явлениях проницаемости и гомеостаза.

Поскольку регуляция проницаемости мембран особенно сильно должна влиять на питание паразитных и микоризообразующих грибов, наблюдаемое обилие у них тирозиназы должно согласовываться с этой точкой зрения. Другим доказательством ее правильности является способность грибной тирозиназы образовывать из L-тирозина или фенилаланина в присутствии аскорбиновой кислоты дигидроксифенилаланин (ДОФА) — предшественник адреналина животных. Продуктом дальнейшего действия тирозиназы на ДОФА или окисленные производные индола оказываются конденсированные, соединения, укрупнение молекул которых ведет к образованию темного пигмента меланина и выявляется в форме посинения мякоти плодовых тел на изломе. Сходным образом протекает меланиногенез у животных.

Другой тип меланинов, не содержащих азота, например у *Daldinia concentrica*, образуется возможно уже при участии лакказы из продуктов конденсации соединений типа стероидов или фенантрена. Однако такие меланины у грибов более редки, а чаще у них обнаруживаются азотсодержащие, сформированные из фрагментов ДОФА или индола. Приписываемая меланинам экологическая роль состоит во всесторонней защите от повреждений в экстремальных условиях обитания, включая солнечную, особенно ультрафиолетовую радиацию, низкие и высокие температуры, сухость воздуха и субстрата. Защитный эффект меланина, по мнению автора этой гипотезы (Н. Н. Ждановой), неспецифичен и сводится к поддержанию нормального для грибной клетки уровня окислительно-восстановительного режима, pH и ионной силы, смещающихся под влиянием экстремальных воздействий (Жданова, 1976).

Пероксидаза и каталаза. Среди оксидаз порфиринового типа, связанных как с кофактором с трехвалентным железом (Fe^{3+}), у грибов также обильно встречаются пероксидаза и каталаза. Первая из них отщепляет кислород от органических перекисей, а вторая расщепляет перекись водорода с образованием атомарного кислорода и воды. Отличие этих ферментов от цитохромов заключается в том, что они не окисляют, а восстанавливают перекиси, вследствие чего их активная форма не восстановленная, а окисленная и функционирует соответственно реакции: $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, а производимая ферментом трансформация субстрата выглядит подобно реакции: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ (Lindenmayer, 1965). Оба этих фермента широко распространены у грибов. Каталаза была обнаружена у *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Myrothecium verrucaria*, *Caldariomyces fumago* (Shaw, Hager, 1961), у ко-

торого она участвует в системе окислительного хлорирования β -кетoadипиновой кислоты и у базидиомицета *Oudemansiella mucida*. Участвует она и в системе окисления глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат у *A. niger* и других плесневых грибов (Андеркофлер, 1963б). Пероксидаза, видимо, очень характерна для дереворазрушающих грибов из категории разрушителей ядровой древесины. Среди изученных Люром 103 видов грибов-дереворазрушителей образующими пероксидазу оказалось только 12%, против 47%, образующих лакказу, и все они относились к разрушителям ядра древесины дуба или сосны.

Отсюда возникает предположение, что окисление циклических компонентов лигнина, разрушителями которого являются эти виды, зависит от наличия у них пероксидазы.

Особенно много пероксидазы оказалось у видов из рода *Phellinus*, в частности у *Phellinus igniarius* (Lyr, 1959). Грибная пероксидаза оказалась сходной с лакказой по их отношению к температуре, хотя и близкой по другим свойствам к растительной пероксидазе. Например, у нее очень близкий к растительной пероксидазе оптимальный pH (5,0—6,3) и температурный коэффициент Q_{10} (повышение активности при увеличении температуры на 10°), близкий к 2,0. Реакция ускоряется при таком коэффициенте до 50%, но, вообще, термостабильность энзима зависит от вида гриба, например, у *Phellinus robustus* энзим инактивируется на 50% при 77°C , а у *Fomes annosus* при 60°C . Этанол в концентрации 4% инактивирует энзим.

Каталаза и пероксидаза обильно накапливаются в мицелии *Penicillium chrysogenum* в процессе ферментации пенициллина, но главным образом внутриклеточно, а в среду выходят только в конце роста в начале автолиза клеток мицелия (Маттисон, 1956).

При анализе пероксидазной активности у грибов дейтеромицетов, живущих на опавших листьях и на хвойном опаде, оказалось, что от 30 до 60% из их числа обладают этой способностью, особенно при выращивании их на субстратах пероксидазного окисления, таких как таннин, галловая кислота, пирогаллол, аскорбат или отвар дубовой коры. Те же виды почвенного происхождения обладали этой способностью не более чем в 1,6% случаев (Борисова, Двойнос, 1972). К числу видов грибов, обладающих высокой пероксидазной активностью, относились виды рода *Cladosporium* (*C. gossypicola*, *C. transchelii*, *C. ovoides*) и *Botrytis cinerea*, особенно активные при выращивании на средах с отварами из листьев березы и дуба.

Из других пероксидаз грибов можно назвать хлорпероксидазу, обнаруженную у *Caldariomyces fumago*, которая осуществляет трансформацию β -кетoadипиновой кислоты в δ -хлорлевулиновую кислоту (Shaw, Hager, 1961). Однако этот процесс, оптимизирующийся при очень низких уровнях pH (pH 2,8), происходит многоэтапно, причем хлорпероксидазой осуществляется только последний этап — окисление с замещением кислорода хлором. В предшествующих этапах этой реакции, которая возможна только в

присутствии всех компонентов комплекса, принимают участие: гидролаза, выщепляющая глюкозу из запасных полисахаридов клетки; глюкозооксидаза, окисляющая эту глюкозу до глюконовой кислоты; каталаза, расщепляющая выделяющуюся при окислении глюкозы перекись водорода на воду и кислород, который в момент выделения с помощью хлорпероксидазы реализует использование хлор-иона для хлорирования β -кетoadипата (Shaw, Hager, 1961).

1. Наблюдения на уровне светового микроскопа и методом центрифугирования

Принципиальное отличие метаболических процессов в живой клетке от реакций, с которыми имеют дело в синтетической химии, состоит в том, что метаболизм живых существ протекает на базе клеточных структур. Кроме того, биологические синтезы в основном являются матричными, в частности синтезы всех видов белков, протекающие на матрицах информационной РНК, синтез которой возможен только на базе соответствующей клеточной структуры. Клетка сравнима со сложнейшей системой цехов со сменой контейнеров с органическими и водными средами и разнообразными адсорбентами. Такая структура обеспечивает необходимую последовательность в работе сложнейшей системы согласованно протекающих реакций обмена веществ, структурная база которого изучена еще далеко не достаточно.

Сведения о морфологии клетки накоплены уже давно, однако функции клеточных структур начали раскрываться только в последние два-три десятилетия, когда было обнаружено значение структурированных матриц, с одной стороны, и разделов сред, т. е. мембран, для протекания синтетических процессов, — с другой. Уже давно было замечено, что в растворах очищенных ферментов скорость синтезов протекает медленнее, чем в клетке. Так зимаза Бюхнера, будучи изолированной из дрожжей, сбрасывает сахар с образованием спирта гораздо менее интенсивно, чем живые и убитые высушиванием дрожжи (Zalokar, 1965).

Клеточные структуры обеспечивают определенный порядок следования метаболических реакций, который при их распаде нарушается, и эффект начинают проявлять только гидролитические энзимы. Для изучения функций тех или иных клеточных структур очень важно сохранить их в нативном, не разрушенном фиксацией или гомогенизацией состоянии, для чего существуют два метода, удовлетворяющие этому требованию: 1) метод прижизненных окрасок, включая люминесцентную микроскопию (Мейсель, 1950); 2) метод прижизненного центрифугирования гиф и последующего проявления преобладающих в разных структурах функциональных групп или энзимов (Zalokar, 1965). Определенную помощь в понимании морфологии клеточных структур дает электронная микроскопия, а в их функциях — анализ фракций после ультрацентрифугирования гомогенатов клеток. Однако и тот и другой метод не лишены недостатков, поскольку один может приводить к артефак-

там при фиксации, а другой к — механическому разрушению многих структур при гомогенизации.

Метод субтоксических концентраций флуоресцирующих красителей для выявления клеточных структур на уровне оптической микроскопии был впервые широко использован Мейселем (1950), получившим специфическое прижизненное окрашивание клеточных органелл дрожжей. Он использовал в этих целях берберин-сульфат, окрашивающий митохондрии и ядра в желтый цвет; акридин-оранж (ядра — зеленые, гранулы волютина — красные); нейтраль-рот (вакуоли — желтые, гранулы волютина — красные) и ауо-фосфин (ядра — зеленые, гранулы волютина — красные, митохондрии — желтые). Янус грюн окрашивает митохондрии в различные оттенки сине-зеленого (при высоком rh) до розового цвета (при низком rh), что зависит от окислительно-восстановительного режима митохондрий.

Сочетание метода центрифугирования гомогенатов клеток с vitalными наблюдениями и микроскопическим контролем полученных фракций весьма полезно для выяснения функций клеточных органелл.

В изучении тонкой структуры клеточных органелл незаменимым является электронно-микроскопическое исследование, с помощью которого различают основные клеточные структуры грибов: мембрану, структуры цитоплазматической сети, включая микросомы и рибосомы, митохондрии, специализированные клеточные органеллы и ядра.

2. Клеточная мембрана

Клеточная мембрана оформлена в виде трех моно-, би- или полимолекулярных слоев, где периферические слои составлены белками, а средний — липидами.

В бимолекулярном слое липидов два ряда молекул соединены гидрофобными концами, а гидрофильные концы обращены к белку (Zalokar, 1965).

Фосфолипиды, входящие в состав клеточных мембран, представляют собой фосфоглицериды жирных кислот, содержащие полярные головные группы в форме положительно заряженных холина или этаноламина, отрицательно заряженного серина или нейтрального гликофосфолипида с гидрофильной головной группой, как в фосфатидилинозите (рис. 7.1). Сочетание в плазматических мембранах фосфоглицеридов с белками может формироваться в виде трех-, четырех-, многослойных образований с фибриллярными и глобулярными белками, полярными и неполярными белковыми структурами или головными группами фосфолипидов (рис. 7.2).

Электронная микроскопия и косвенные методы исследования по проницаемости клеток для воды (Solomon, 1961; Rotstein, 1965), антисептиков и антибиотиков (Becker, 1968) по проницаемости мембран для синтетических полисахаридов показали наличие в

мембранах многочисленных пор разнообразного размера, характерного для каждой крупной таксономической группы организмов. Сложность строения клеточных мембран грибов была показана на примере их строения у дрожжей, обнаруживаемого с помощью сканирующего электронного микроскопа и техники замораживания и скалывания. В толще мембраны выявляются многочисленные

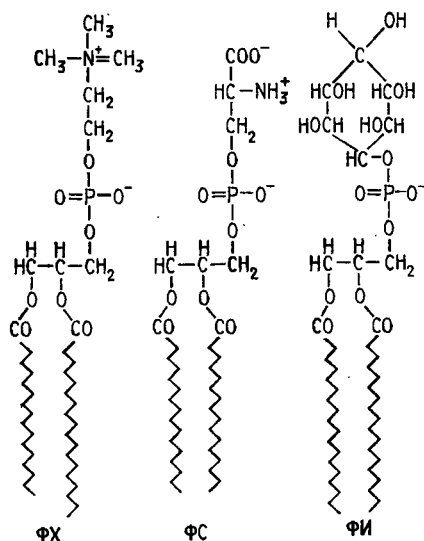
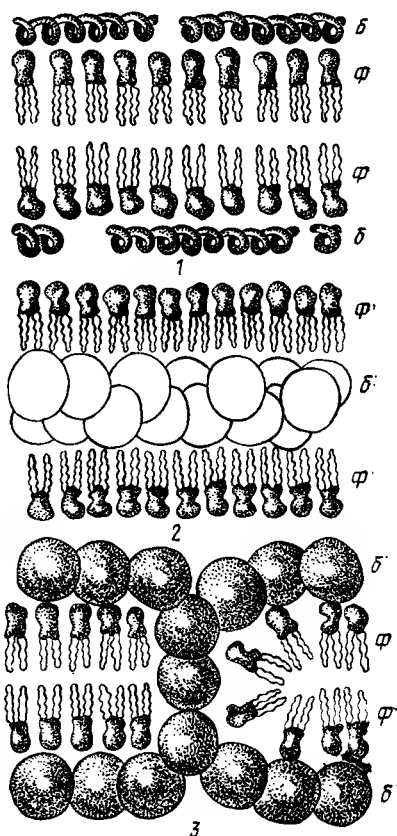


Рис. 7.1. Фосфоглицериды клеточных мембран: ФХ — фосфатидилхолин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозит (Либберт, 1976)

Рис. 7.2. Структуры клеточных мембран, составленных: 1 — из фосфолипидов и фибриллярных белков; 2 — из фосфолипидов и нейтральных глобулярных белков; 3 — из фосфолипидов и полярных глобулярных белков; Ф — фосфолипиды; Б — белки (Либберт, 1976)



гексагональные структуры и система тяжей, пролиферирующих в область клеточной оболочки (Фрей-Висслинг, 1976; Burnett, 1968).

Основное назначение клеточных мембран, которые в молодых клетках гиф грибов тесно связаны с оболочкой (Беккер, 1956), состоит в регуляции активной проницаемости клеток для поступающих из среды веществ.

Структура клеточных мембран может меняться в зависимости от жирно-кислотного состава ее липидов (Н. В. Усольцева, В. А. Усольцева, 1980). Преобладание в ее составе ненасыщенных

жирных кислот придает ей свойства флюидности, а насыщенных — ригидности, что в свою очередь сказывается на интенсивности протекающего в плазмалемме синтеза экзоферментов (Borris, 1981). Доказательством наличия периодических процессов уплотнения и разжижения клеточных мембран у грибов могут служить наблюдения над составом жирных кислот в мицелии *Neurospora* (Brody, Martins, 1976), у которой количество ненасыщенных жирных кислот колеблется в пределах суточного цикла роста от 37 до 83%.

Функцией липидных слоев, включающих стероиды, является сохранение структуры клеточных мембран и создание барьеров против бесконтрольного поступления и выделения из клеток макромолекул и ионов. Ряд синтезов в процессе обмена грибов может протекать в пределах мембран, например синтез полисахаридных и хитиновых оболочек и экзоферментов (Borris, 1981), а также формирование путем инвагинации мембраны целого ряда клеточных органелл.

3. Митохондрии (хондриосомы)

Митохондрии, окислительно-восстановительные функции которых у грибов близки к функциям некоторых пластид высших растений (Lindenberg, Ernster, 1954; Schneider, 1955), у этого типа организмов очень обильны. Изучение их морфологии проводится методами электронной микроскопии, а биохимические функции изучаются методами ультрацентрифугирования. Центрифугированием клеточных гомогенатов при последовательном увеличении числа оборотов или при центрифугировании в среде с градиентом плотности можно разделить гомогенаты клеток на большое число фракций, распределяющихся по их удельному весу.

Структура митохондрий представляет нечто сходное с пеналом, разделенным на ряд камер с общей оболочкой, связанной в единое целое с перфорированными или неполно отделяющими камеры друг от друга кристами (рис. 7.3).

Субмикроскопическое устройство оболочек митохондрий и крист предположительно сходно с постулируемым для строения клеточных мембран, представляя собой бимолекулярный слой липидов, заключенный между двумя слоями белка (Sjostrand, 1955). Белковая часть крист и оболочек митохондрий несет ферменты в форме грибовидных образований, а липидный слой, включающий стероиды и значительное количество миоинозита, обеспечивает поддержание их структуры и специфической проницаемости (Zolotar, 1965). У грибов, как и у животных, кристы митохондрий имеют палисадный характер в противоположность относительно беспорядочному расположению трубчатых структур, типичных для высших растений. Митохондрии с кристами палисадного типа были обнаружены у *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans* (Nečas et al., 1963) и других видов порядка *Mucorales*, у *Piricularia oryzae* (Хакимова и др., 1974), в макроконидиях и мицелии хищного гри-

ба *Arthrobotrys* (Теплякова, 1977), в гаусториях ржавчинных грибов (Плотникова, Сассен, 1974). У *Piricularia oryzae* митохондрии встречаются в метаболизирующем мицелии и почти не выражены в

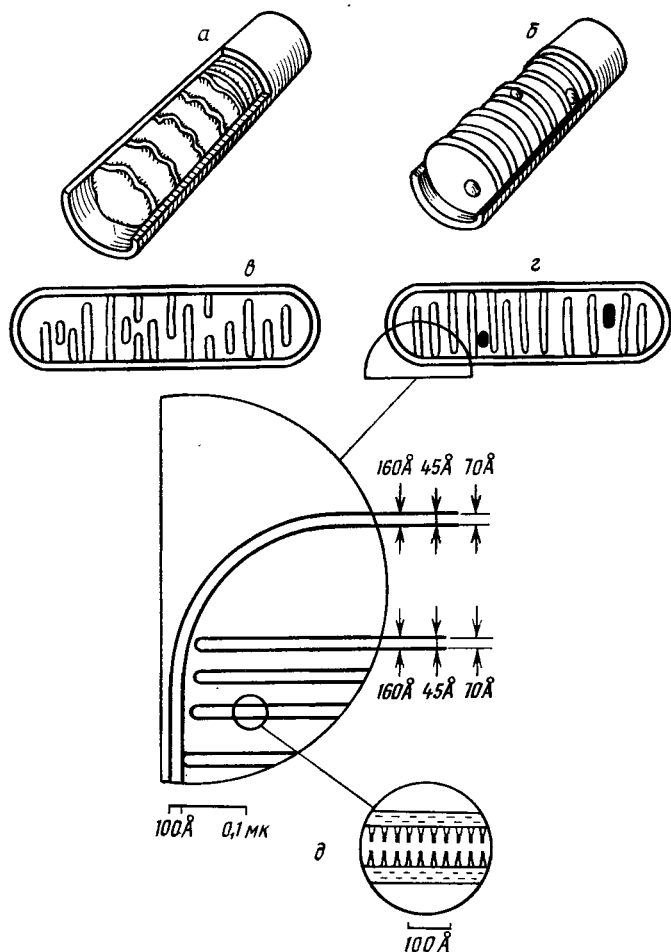


Рис. 7.3. Схематическое изображение ультраструктуры митохондрий двух типов (*а* и *б*); *в*, *г* — схемы разрезов митохондрий типов (*а* и *б*); *д* — размеры некоторых элементов митохондриальных мембран. В маленьком кружке предположительная схема молекулярной структуры мембран: двойной липидный слой расположен между двумя слоями белка (Sjostrand, 1955)

формирующихся конидиях. В молодом интенсивно растущем мицелии *Penicillium chrysogenum* митохондрии имеют обычный для грибов вид обособленных телец с параллельно расположенными кристами, а через 42 ч роста митохондрии разрастаются в сильно разветвленные образования с хаотично расположенными кристами

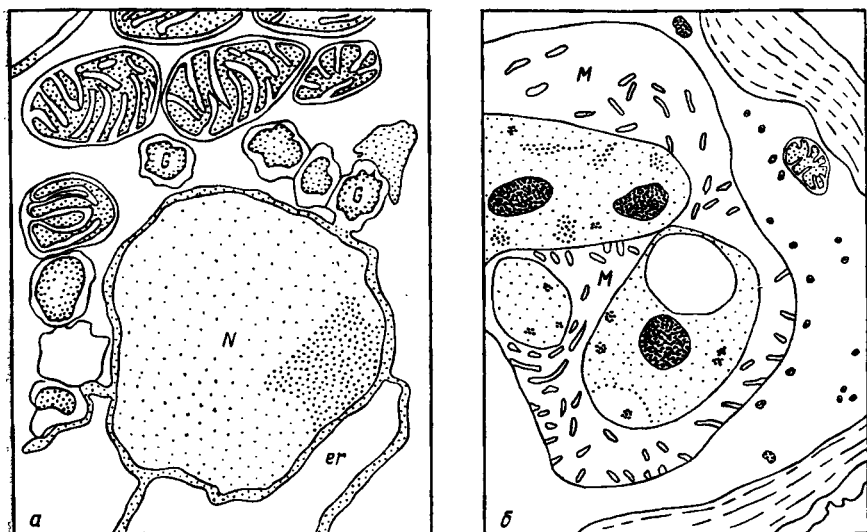


Рис. 7.4. Схематическое изображение митохондрий высокоактивного штамма *Penicillium chrysogenum* в мицелии из погруженной культуры при ферментации пенициллина: а — после 24 ч. роста; митохондрии с кристами; N — ядро; G — пузырьки аппарата Гольджи; er — эндоплазматический ретикулум; б — после 72 ч. роста; M — слитый хондриом с различно расположенными кристами в его матриксе (по Kurylowicz et al., 1980)

(рис. 7.4а, б/Kurylowicz et al., 1980). В растущих сумках дискомицетов также разветвленные митохондрии могут быть совсем лишены крист и напоминают митохондриальные ретикулы, характерные для растений (Камалетдинова, Васильев, 1982).

4. Рибосомы (микросомы)

Рибосомы в живой клетке обычно тесно связаны с уплотненными мембраноподобными структурами эндоплазматического ретикулума, в сеть которого они включаются, как бы инкрустируя его (Ролан и др., 1978). Однако на основе работ по ультрацентрифугированию живых гиф грибов с ненарушенной гомогенизацией структурой (Zoloka, 1965) и электронной микроскопией (Камалетдинова, Васильев, 1982) выводится заключение, что у этих организмов рибосомы существуют как моносомы и отдельно от эндоплазматического ретикулума, который у грибов в основном представлен в виде гладких агранулярных образований. В эндоплазматической сети рибосомы часто встречаются в виде полисом, взаимосвязанных через цепь матричной РНК.

Рибосомы составлены в основном из РНК и протеинов, содержат относительно немного ферментов. Соотношение между РНК и протеинами в рибосомах гифообразующих грибов обычно рас-

пределяется пополам, у дрожжей несколько преобладают протеины (табл. 7.1).

При инкубации с ионом магния рибосомы грибов способны распадаться на субъединицы размером порядка от 10^5 до 80^5 у гиообразующих *Aspergillus niger* (Mover, Storck, 1964) и *Neurospora* (Zolokar, 1965) и от 5^5 до 60^5 у *Saccharomyces cerevisiae*.

Таблица 7.1

Содержание РНК и протеинов в рибосомах грибов и типы субъединиц, получаемых при их инкубировании с Mg^{2+} (Storck, 1964; Zolokar, 1965)

Вид гриба	Содержание, %		Типы субъединиц рибосом при инкубации с Mg^{2+}				
	РНК	Протеины					
<i>Neurospora</i>	46,6	53,4	13^5	19^5	80^5		
<i>Aspergillus niger</i>	53	47	10^5	15^5	19^5		
<i>Schisosaccharomyces</i> sp.	41	59					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42	58	5^5	19^5	28^5	40^5	60^5

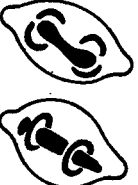
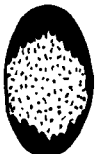
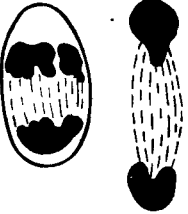
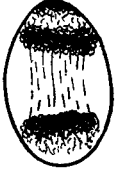
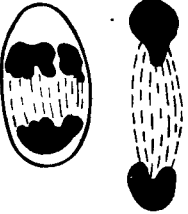
З а м е ч а н и е: s — константа седиментации.

Поскольку рибосомы представляют клеточную структуру, имеющую прямое отношение к синтезу белка, они содержат транспортную, рибосомальную и информационную РНК, тогда как в супернатанте РНК остается мало. В рибосомах, адсорбированных на эндоплазматическом ретикулуле, при смешивании их с супернатантом синтез белка протекает интенсивнее, что происходит вследствие обеспечения лучшего их контакта с расположенным в эндоплазматической сети пулом аминокислот и материалом для синтеза из внешней среды (Zolokar, 1965).

5. Ядро

Ядерная оболочка грибов (*Piriculariae oryzae*, *Rhizopus nigricans*) двухслойная, толщиной 200 А, снабженная порами диаметром 600—800 А. У метаболизирующего ядра вегетативных гиф ядерная оболочка складчатая, что, вероятно, связано с увеличением его поверхности в процессе адаптации к активному обмену с цитоплазмой (Хакимова, 1971; Nečas et al., 1963). Ядерные поры грибов имеют гранулярную или фибриллярную структуру (Фрей-Висслинг, 1976). В полости ядра, например, *Penicillium chrysogenum* встречаются многочисленные гранулы и нитчатые тельца, состав и назначение которых не ясны. В ядре локализуются фермен-

Авторы	Webb, 1935; Robinow, 1963; McGinnis, 1933—1956	Robinow, 1957, 1963; Bakerspigel, 1960	Robinow, 1963, 1965
--------	--	---	------------------------

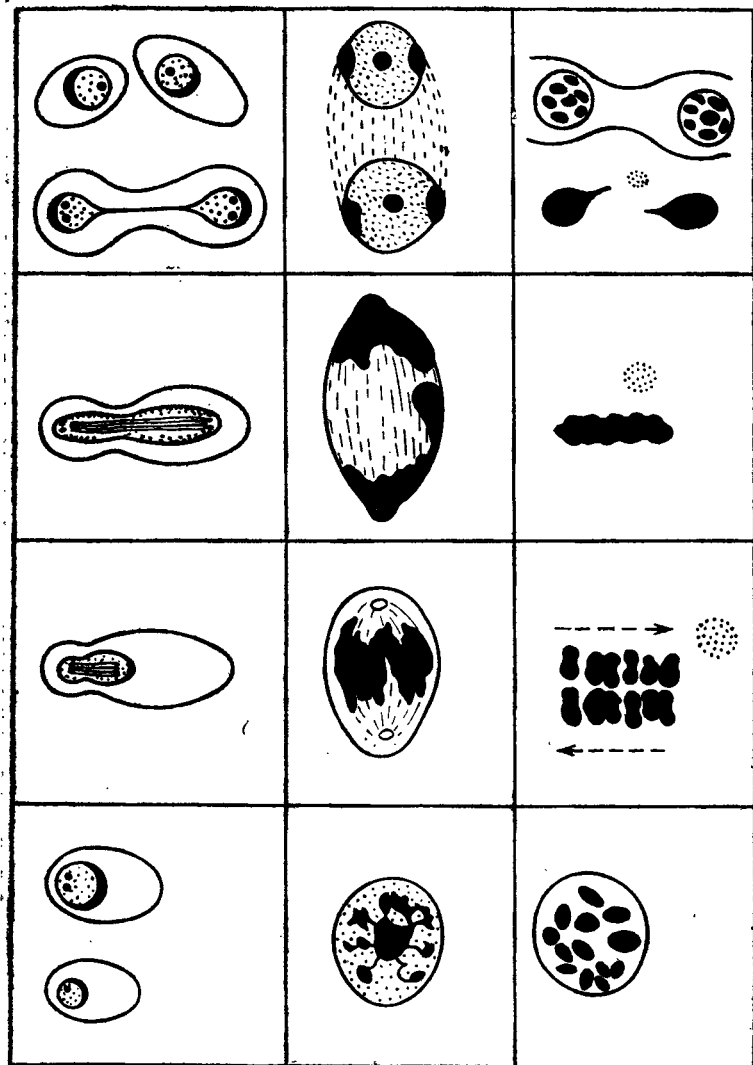
Фазы соматического деления ядер				
профаза	метафаза	анафаза	телофаза	
				
				
				

Тип деления	Таксономическое положение объекта
Элементы веретена (центральный тж) из ядрышка, без центриолей	<i>Spongopora subterranea</i> (Plasmodiophorales), сходно у <i>Penicillium</i> , <i>Rhizoglyphus</i> (кольца хроматина) <i>Mucor hiemalis</i> (Zygomycetes, Mucoraceae), также <i>Saprolegnia</i> (Oomycetes), <i>Empusa</i> , <i>Cnidobolus</i> (Entomophthoraceae) <i>Bastidiobolus ranarum</i> (Zygomycetes, Entomophthoraceae)

Robinow,
Marak, 1966

Knox-Davies,
1956;
Girbardt,
1962;
Robinow,
Marak, 1963
Bakerspigel,
1959;
Lu, 1964

Robinow,
1961;
Мацкевич
и др., 1965,
1974;
Макимова,
Пальмова,
1968;
Беккер,
Пушкарева,
1973



Saccharomyces cerevisiae, *S. uvarum*, *S. pastorianus* (Ascomycetes, Saccharomycetaceae)

Macrophomina phaseolina (Deuteromycetes, Ruyndiales). Сходно у *Atomyces macrosporus* (Chytridiaceae), *Polystictus*, *Schizophyllum*, *Cyathus stercorarius* (Basidiomycetes)

Lipomyces lipofer (Ascomycetes, Endomycetales), сходно у *Piricularia oryzae*, *Candida tropicalis*, *Trichothecium roseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* (Deuteromycetes)

Рис. 7.5. Сводная схема типов соматических делений ядра у грибов с помощью аппарата веретена различного происхождения, способом сегрегации хромосом и скопления геномов

ты, участвующие в синтезе нуклеиновых кислот, ядерных белков, нуклеопротеидов и нуклеотидов. Имеются сведения о локализации в ядре центра синтеза дегидрогеназ пиридинового и флавинового типов.

Основной морфологической особенностью ядер грибов является разнообразие способов их деления и образования ядерного веретена, а также подобно инфузориям явление «ядерного дуализма».

Центриоли у большинства грибов, кроме некоторых оомицетов и зигомицетов, отсутствуют. Вместо них к оболочкам ядер прилегают гранулярные или дисковидные электронноплотные тельца с диаметром 0,5—2 мкм, толщиной 70 мкм, называемые полярными тельцами веретена (ПТВ). Расположение их и связывающих их микротрубочек веретена в поздней анафазе деления ядра дискомицета *Peziza badia* показано в атласе (Камалетдинова, Васильев, 1982/рис. 26). Как ПТВ, так и микротрубочки предсуществуют в клетках сумчатых и базидиальных грибов, обнаруживаются в них в промежутках между митозами. ПТВ составлены из плотноупакованных гранул или трубочек и, видимо, самовоспроизводятся, так как содержат белок, РНК и, возможно, также ДНК (Камалетдинова, Васильев, 1982). Микротрубочки составлены из специфического белка — тубулина.

По типу образования ядерного веретена грибы можно

разделить на две основные группы (рис. 7.5): 1) группа, включающая миксомицеты, оомицеты и зигомицеты, с веретеном, образующимся из ядрышка, и с формированием колец или колпачков хроматина на полюсах деления в анафазе, и 2) группа хитридиевых, базидиальных, сумчатых и несовершенных грибов с веретеном, образующимся из предсуществующих микротрубочек (Burnett, 1968), с ПТВ и исчезающим во время деления ядрышком.

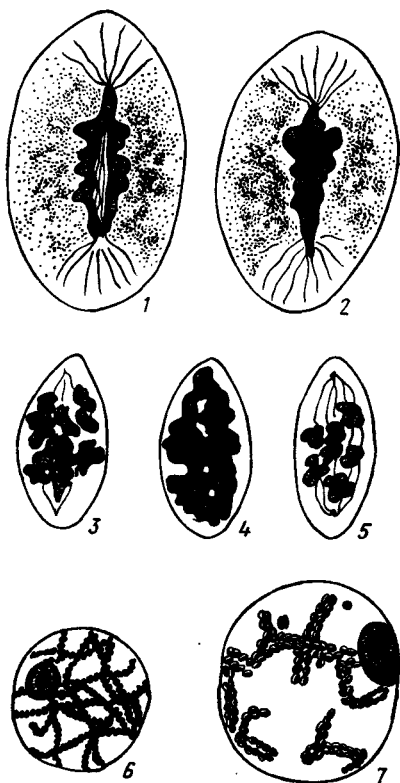


Рис. 7.6. Слияние хромосом и распределение их по длине веретена в метафазе в вегетативных гифах грибов ржавчины (1—5). Формирование бивалентов хромосом в профазе деления (6—7) (Курсантов, 1915)

Для деления ядер в вегетативных гифах характерно слипание хромосом и распределение их в метафазе по всей длине веретена, как это можно видеть на примере грибов ржавчины (рис. 7.6/Курсанов, 1915). Поэтому подсчитать их число в вегетативных образованиях практически невозможно и удастся с достаточной точно-

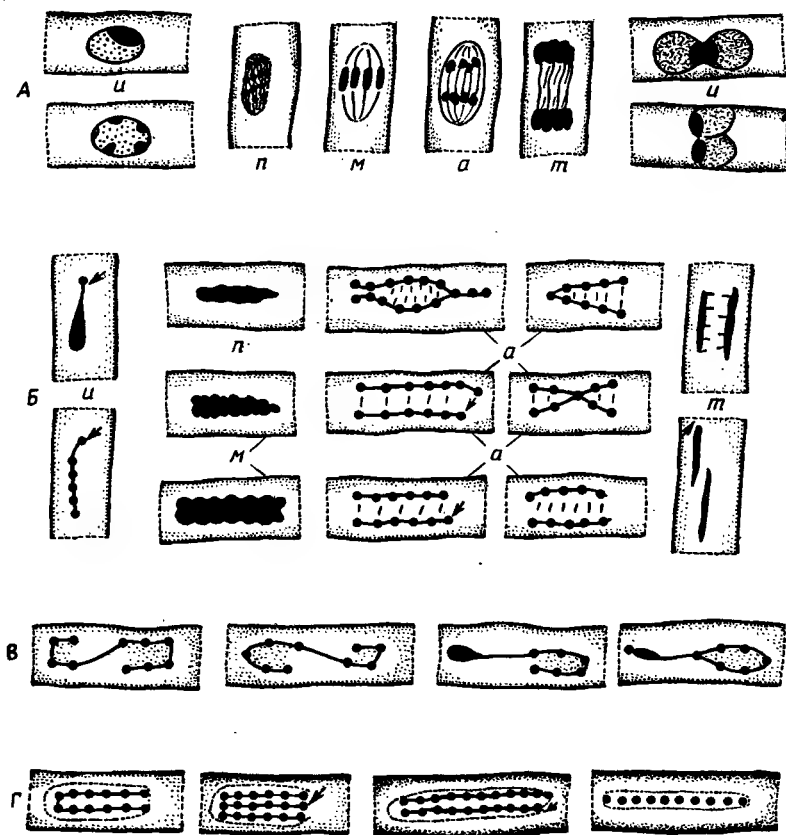


Рис. 7.7. Различные типы деления ядра у *Piricularia oryzae*: а — деление по типу классического митоза; б — деление по типу сегрегации геномов с образованием сборных хромосом. Стрелками обозначены полярные тельца веретена (ПТВ); в — атипичный митоз; г — диплоидные и полиплоидные ядра (Хакимова, 1971)

стью только при их четком разобщиении в процессе редукционного деления (Olive, 1965). Для вегетативных структур грибов характерно параллельное существование ряда разнообразных способов деления. При соматических делениях *Piricularia oryzae* (Хакимова, 1971) их можно насчитать не менее пяти: классический митоз, деление путем скольжения хроматина вдоль оси, отмеченное также

у *Lypomyces* (Robinow, 1965), путем сегрегации геномов, атипичное с образованием анеуплоидов с неравным числом хромосом и деление без расхождения геномов, ведущее к образованию полиплоидных ядер (рис. 7.7). Сходная картина разнообразных способов деления ядер была обнаружена в мицелии и конидиеносцах хищного гриба *Arthrobotrys* (Теплякова, 1977).

У ряда грибов обнаружено явление ядерного дуализма. У *Penicillium chrysogenum* наблюдается на ранних этапах развития, а у *Fusarium oxysporum* и позднее два типа ядер — крупные неделящиеся, с хроматином по периферии ядра и мелкие, целиком заполненные хроматином, часто находящиеся в стадии деления (Беккер, 1956, 1975). Такая картина обнаруживается при окраске исследуемого объекта по методу Фельгена. Прижизненная окраска акридин-оранж показала, что крупные ядра — желтые, тогда как мелкие — зеленые (Беккер, Чадова, 1973), что говорит об обогащении мелких ядер ДНК, тогда как в крупных имеется и большая доля РНК. Эта особенность ядер грибов чрезвычайно сходна с характерной для микро- и макронуклеусов инфузорий. Существование в онтогенезе грибов ядерного дуализма имеет огромное значение для их адаптивной способности и изменчивости. Формирование у грибов крупных, видимо, полиплоидных ядер, гомологов макронуклеусов, возможно, начинается, как и у инфузорий, с эндополиплоидии, которая была установлена у дрожжей и гифообразующих грибов (Мацкевич, Головня, 1965; Мацкевич, 1981). Назначение мелких генеративных ядер грибов аналогично микронуклеусам у инфузорий состоит, по-видимому, в сохранении всей генетической информации в целом.

Из других структурных элементов грибных клеток можно упомянуть о ломасомах, часто расположенных в углах соприкосновения септы с боковой клеточной стенкой, о диктиосомах, связанных с жгутиками зооспор (Громов, Мамкаева, 1975), и о лизосомах, представляющих собой часть вакуолярного аппарата клетки. Встречаются иногда в заметных количествах пигментированные элементы, осмофильные и не осмофильные липидные включения, отграниченные от цитоплазмы однослойной оболочкой (Камалетдинова, Васильев, 1982).

6. Цитоплазма

Цитоплазма грибов, как и у других организмов, структурирована в форме ретикулума и имеет характер системы мембран с периодическими цистернами и уплотнениями. Такая мембранного типа цитоплазма была обнаружена у *Rhizopus nigricans* и у ряда дискомицетов, у которых были найдены образования типа вакуолей, сходные с аппаратом Гольджи животных, но в форме отдельных цистерн с секреторными вакуолями 0,3 мкм в диаметре (Nečas et al., 1964).

В форме микровacuолей выявляются содержащие протеолитические ферменты и участвующие в лизисе клеточных органелл лизо-

сомы, особенно обильные в периоды, предшествующие лизису вегетативных структур у грибов.

В цитоплазме могут быть локализованы в виде пучков или обособленных телец микротрубочки, участвующие в построении ядерного веретена (Girbardt, 1962), микротельца с еще неясными функциями и составом, мультивезикулярные образования и отдельные пузырьки, являющиеся местами локализации ферментов и материалов для построения клеточных структур.

Из других, помимо упомянутых липидов, запасных веществ, используемых в энергетическом обмене, в цитоплазме клеток грибов часто встречается гликоген, в α -форме в виде звездчатых образований или в разветвленной β -форме (Камалетдинова, Васильев, 1982). С переработкой гликогена, видимо, связано присутствие в молодых, интенсивно растущих сумках дискомицетов цистерн с ламеллярной мембранной структурой (рис. 7.8), встречающихся и у других грибов, например в мицелии *Penicillium chrysogenum* (Kurylowicz et al., 1980). Эти структуры, так же как и пятнистые электронно-плотные гранулы, вероятно, являются центром образования обильной слизи, характерной для сумок плодовых тел дискомицетов. Процесс их формирования имеет поразительное морфологическое сходство с формированием слизи сурфактанта в легочных альвеолах животных (рис. 7.9) (Ерохин, Филиппенко, 1981).

Структуры типа цистерн гладкого эндоплазматического ретикулаума могут быть местом синтеза или временными местами хранения экзоферментов, фитотоксинов и антибиотиков, выделяемых грибами в окружающую среду. Такого рода сведения известны для высокопродуктивного штамма *Penicillium chrysogenum*, у которого местом накопления пенициллина являются подобные цистерны $d=40$ нм, расположенные по периферии клетки близ плазмалеммы (см. атлас Kurylowicz et al., 1980/рис. 101). Наличие в них пенициллина показано с помощью обработки мицелия меченной ферритином β -лактомазой. Фракционирование клеточных структур методом ультрацентрифугирования и определения в них радиоактивной метки предшественника и содержания пенициллина подтвер-



Рис. 7.8. Схема формирования концентрических секреторных вакуолей в молодой сумке дискомицета *Rhytisma salicinum* (по Камалетдиновой, 1975)

дило эти заключения, показав максимальную активность того и другого в больших вакуолях и в цистернах с диаметром 40 нм (табл. 7.2).

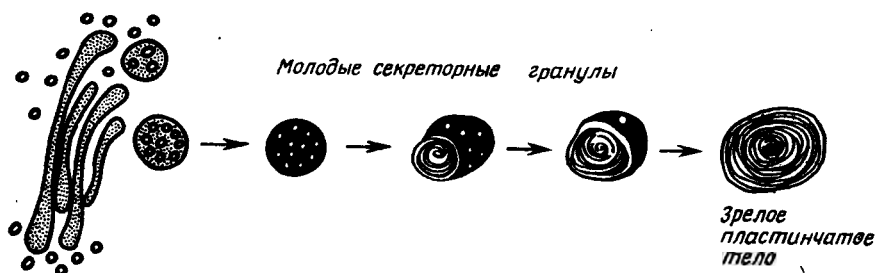


Рис. 7.9. Схема формирования секреторных гранул в цитоплазме клеток легочных альвеол млекопитающих, в которых синтезируется слизистый сурфактант (Ерохин, Филиппенко, 1981)

Микросомальные фракции цитоплазмы с частицами, близкими по размерам к рибосомам и эндоплазматическим цистернам грибов и дрожжей из родов *Candida*, *Torulopsis*, являются центрами

Таблица 7.2

Органеллы, изолированные из клеток *Penicillium chrysogenum*, и содержание в них антибиотика (по Kurylowicz et al., 1980)

Фракции клеток	Фракционирование ультрацентрифугированием	Биологическая активность бензилпенициллина в ед. на 1 мг белка	Радиоактивность в импульсах (cp^m) в мни на 1 мг белка
Клеточный остаток	200	10	70
Ядра	1 000	30	170
Большие вакуоли	3 000	120	810
Митохондрии	10 000	30	140
Пузырьки 200 нм	30 000	50	350
Пузырьки 100 нм	70 000	100	500
Пузырьки 40 нм	100 000	120	770

системы энзимов — оксигеназ, производящих окисление углеводов и эндогенных липидов, где характерным для этих систем компонентом является цитохром P-450 (Weete, 1980). Подобные ферменты эндоплазматического ретикулума являются основным компонентом, формирующим бесклеточную люминесцирующую систему гомогената из клеток нитчатых грибов, функционирующую на основе системы люциферин-люцифераза (Airth et al., 1969).

7. Поровые устройства грибов

Поровые аппараты грибов не могут быть отнесены к самостоятельным органеллам клетки, так как являются частью поперечной клеточной септы. Самостоятельное значение поровых устройств как лабильных клеточных органелл заключается в том, что они либо разрешают обмен клеток питательным материалом или даже органеллами вплоть до ядер, либо полностью замыкают их от соседствующих с ними сегментов мицелия. Поскольку у грибов дру-

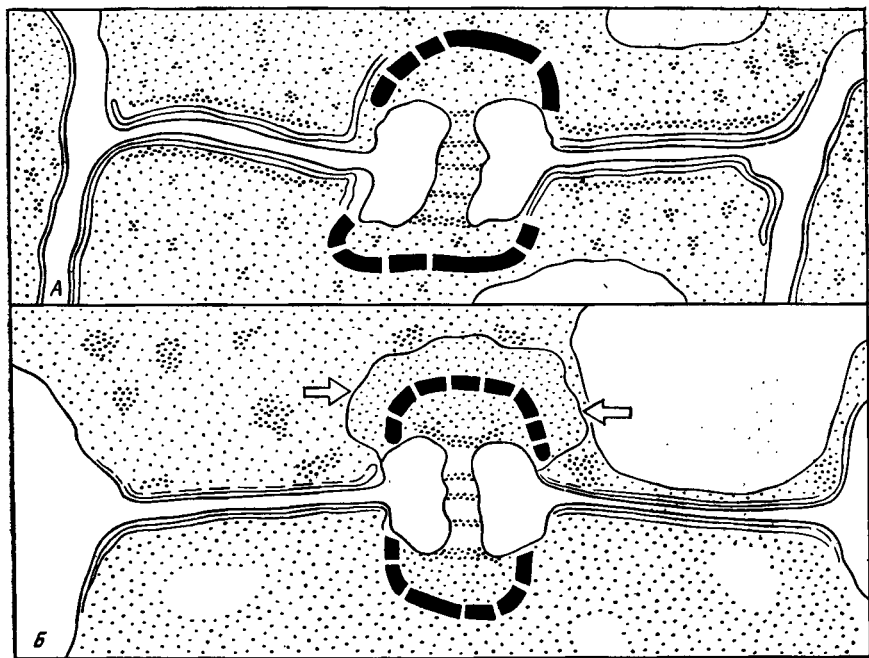


Рис. 7.10. Схема долипор плодового тела базидиомицета *Agrocybe praecox*: а — септа гимениальной области; б — септа в пограничной области между гимением и субгимением. Электронно-плотный колпачок присутствует только со стороны субгимения (стрелки); такие же колпачки окружают с обеих сторон септы долипоры, расположенные в ткани остального субгимения (Gull, 1978)

гих средств связи между клетками, таких как плазмодесмы, не существует, то она возможна для них только через поры септ, и состояние мицелия с замкнутыми пробками может рассматриваться как одноклеточное, а сам мицелий — как популяция одноклеточных форм, что может привести к далеко идущим выводам в плане экологии и генетики.

Сложные долипоры базидиальных грибов обратили на себя внимание давно, и изучение их показало, что они снабжены боковыми выростами — парентосомами, прикрывающими сверху от-

верстие септы двусторонними колпачками (Gull, 1978) и затыкающими туннель поры пробками, состоящими из белковых филаментов, растворяемых протеолитическими ферментами (Flegler et al., 1976). В вегетативном мицелии голобазидиальных агариковых грибов долипоры обычно закрыты пробками и колпачками парентосом, тогда как в гимении плодовых тел в обрамлении долипор наблюдаются перфорации, а пробки и колпачки отсутствуют (рис. 7.10, а, б) и обмен цитоплазмой и органеллами между сег-

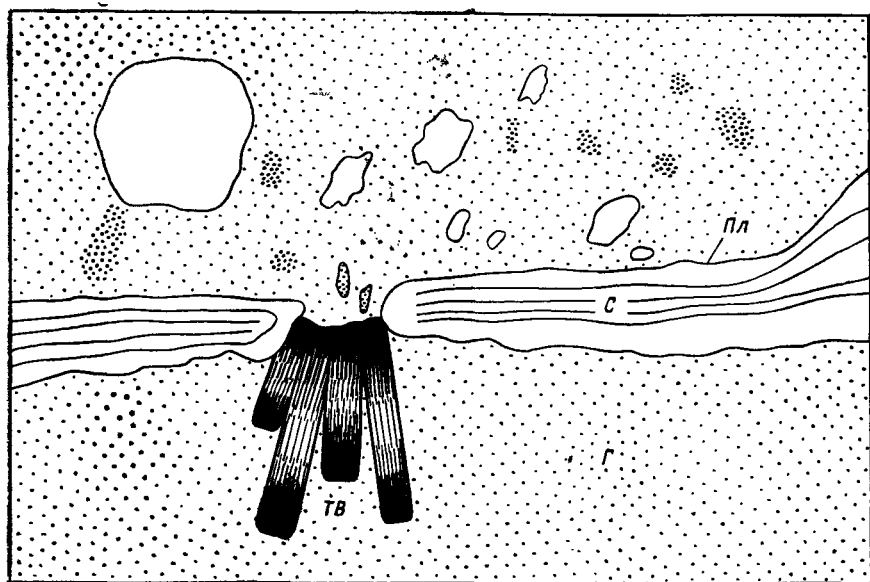


Рис. 7.11. Схема септальной поры медуллярного эксципула плодового тела дискомицета *Morchella conica*, закрытая пластинчатыми тельцами Вороина (ТВ): С — септа; Пл — плазмалемма (по Камалетдиновой, Васильеву, 1982)

ментами гиф плодового тела протекает беспрепятственно. Закрытая колпачками и пробками зона остается только на границе гимения и субгимения, причем колпачок и неперфарированное обрамление сохраняются только на пограничной стороне субгимения (Burnett, 1968). Это правило соблюдается также у сумчатых дискомицетов, у которых изолирующие устройства пор располагаются обычно между гимением и субгимением с пограничной стороны последнего (Камалетдинова, Васильев, 1982). У дейтеромицетов такие изолирующие устройства наблюдаются в местах отчленения конидий или между отдельными клетками в многоклеточных конидиях, исчезая при их прорастании (Murrey, Maxwell, 1976). Они встречаются и в гифах мицелия продуцента пенициллина *Penicillium chrysogenum* (см. атлас Kurylowicz et al., 1980, рис. 42).

У сумчатых грибов из порядка дискомицетов имеется чрезвычайно разнообразие замыкающих поровых устройств (Камалетдинова, Васильев, 1982/рис. 9). Их известно не менее пяти: диафрагмы, куполовидные тельца, тельца Воронина, полосатые тельца и пробки. Для более примитивной группы иноперкулятных дискомицетов характерно лабильное и наименее плотное замыкание поры тельцем Воронина, которое происходит, возможно, с помощью сократительных движений микрофиламентов. Тельца Воронина дисковидной формы в такой закрытой поре могут быть расположены по несколку штук (рис. 7.11). Такие изоляции весьма лабильны. Они легко открываются и снова закрываются в зависимости от физиологического состояния клеток гиф, регулируя при этом ток цитоплазмы или поступление питательных веществ из одного сегмента гиф в другой. Формирование изолирующих устройств в виде телец Воронина не связано со старением гиф или только с экстремальными условиями среды, как наблюдалось ранее у *Neurospora* (Trinci, Collinge, 1974) и у *Ascodesmis sphaerospora* (Brenner, Carrol, 1968). Так, в активно растущих жизнеспособных колониях *Erysiphe graminis* до 80% септальных пор закрыты пробками из телец Воронина (McKeen, 1971), что говорит о их роли в специализированной дифференциации обмена.

Изолирующее устройство иноперкулятных дискомицетов и иноперкулятных форм включает кроме телец Воронина еще и диафрагму — лнзобразное герметичное образование в просвете поры, происходящее от пролиферации септы и ограниченное с двух сторон плазматической мембраной. Разрастание и перекрывание диафрагмы фибриллярным или гранулярным материалом формирует еще более герметичное куполовидное тельце. В ряде случаев диафрагма замеща-

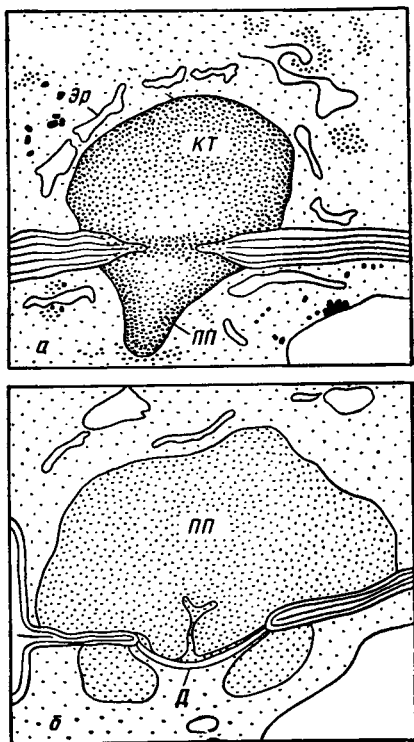


Рис. 7.12. Схема полных поровых пробок в основании сумок плодовых тел дискомицетов: а — куполовидное тельце (КТ) с полной пробкой (ПП) в поре основания сумки *Scutellinia scutellata*; Эр — эндоплазматический ретикулум; б — полная пробка (ПП) с диафрагмой (Д) в основании молодой сумки *Peziza varia* (по Камалетдиновой, Васильеву, 1982)

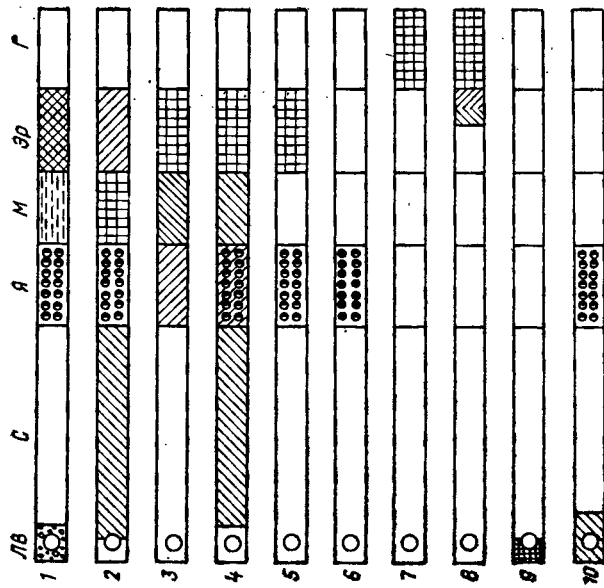


Рис. 7.13. Схематическое изображение результатов цитохимического анализа распределения протеинов, нуклеотидов, липидов и углеводов в клеточных органеллах *Neurospora crassa* после центрифугирования мицелия (направление центробежной силы слева направо): 1 — распределение оргanelл по длине гифы; LB — липиды и вакуоли; C — супернатант (цитоплазма); A — ядра; M — митохондрии; ЭР — эндоплазматический ретикулум и рибосомы; Г — гликоген; 2 — реакция Паули на протеины; 3 — реакция Сакагучи на протеины (аргинин); 4 — реакция Барнетта и Зеллигмана (на SH-связан протенин); 5 — окраска РНК (акридин — оранж); 6 — окраска ДНК ядер по Хюбшману (азура — O_2); 7 — реакция Бауэра на гликоген; 8 — реакция Гочкиса на углеводы (перидодат — Шифф); 9 — реакция на жиры (судан IV); 10 — окраска на липиды (тетрацид осмия); (по М. Zalokar, 1965)

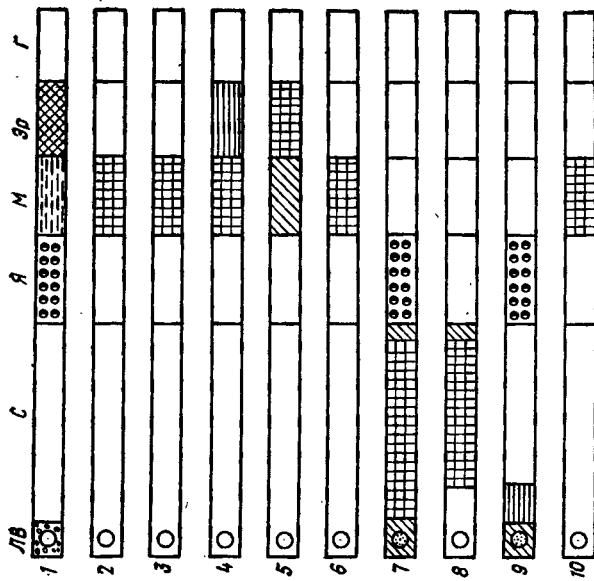


Рис. 7.14. Схематическое изображение результатов цитохимического анализа распределения ферментов в клеточных органеллах *Neurospora crassa* после центрифугирования мицелия (направление центробежной силы слева направо): 1 — распределение оргanelл по длине гифы их обозначения как на рис. 7.13; 2 — сукцинатдегидрогеназа (тетрозолиф); 3 — цитохромоксидаза (НАДН); 4 — пероксидаза (бензидин); 5 — пероксидаза (десятиминутная); 6 — β -галактоксидаза; 7 — щелочная фосфатаза, реакция Гомори (адеозин-3-фосфат); 8 — щелочная фосфатаза (p-нафтилфосфат, диазо-синяя); 9 — кислая фосфатаза, реакция Гомори (глиперофосфат); 10 — кислая фосфатаза (p-нафтилфосфат, диазо-синяя) (по М. Zalokar, 1966)

ется полосатым тельцем, фильтрующим устройством, составленным из стопок дисков или цилиндров полисахаридной природы. Все эти образования могут комбинироваться до формирования полной пробки, обеспечивающей наиболее герметичную изоляцию клетки (рис. 7.12/Камалетдинова, Васильев, 1982/рис. 11, 15).

Изолирующие и фильтрующие устройства имеют несомненное отношение к приспособительной онтогенетической дифференциации, которая так развита в царстве грибов.

8. Локализация в клеточных органеллах звеньев обмена веществ

Для выяснения локализации в различных клеточных органеллах разных звеньев обмена веществ и соответствующих им ферментных систем оказался очень полезным предложенный Залокаром (Zolokar, 1965) метод нативного центрифугирования содержащего живых гиф грибов в ультрацентрифуге при центробежной силе от 10 000 до 100 000 г/см. Преимущество метода заключается в отсутствии артефактов, которые неизбежно бывают при работе с гомогенатами, и в возможности проверить их отсутствие с помощью контроля жизнеспособности отцентрифугированных гиф по продолжению их роста на питательной среде.

Цитохимический анализ составных частей клетки показал следующее расположение в клеточных органеллах грибов мест биосинтетических реакций клетки (Zolokar, 1965/рис. 7.13, 7.14).

В ядре локализуется синтез ДНК, РНК, НАД, располагаются энзимы нуклеозидфосфорилаза, аргиназа, ДНК- и РНК-полимераза и НАД-синтетаза, локализуется синтез протеинов. Локализация синтеза РНК в ядре подтверждена с помощью сочетания центрифугирования живых гиф с ауторадиографией.

В митохондриях локализованы:

1) синтез всех кислот цикла Кребса; 2) обмен жиров и липидов и их синтез; 3) окислительное фосфорилирование, локализация фосфатаз и субстратов их действия (АМФ, АДФ, АТФ); 4) дыхательная цепь ферментов, НАД, НАДФ, флавиновые энзимы, цитохромы, цитохромоксидаза, цитохромредуктаза; 5) пероксидаза; 6) ферменты, участвующие в аминировании, в образовании пептидных связей, протеолитические ферменты, трансаминазы, система ферментов, производящих синтез оротовой кислоты и предшественников пуринов и т. д.; 7) некоторые ферменты углеводного обмена (β -галактозидаза).

Рибосомы представляют собой место синтеза белка, содержат РНК и ацилирующие энзимы, холин- и витамин А-эстеразы, апиразу. В идентичной по размерам частиц микросомальной фракции содержатся ферменты переработки углеводов и липидов, энзимы, связанные с явлением люминесценции.

В цитоплазматической гидрофильной фракции содержатся главным образом энзимы, участвующие в процессах гликолиза. К числу ферментов, локализованных в пределах клеточной мембраны,

относятся такие гидролитические ферменты, как инвертаза, целлобиаза, трегалаза и мальтаза.

Ознакомление с локализацией процессов обмена в клеточных структурах имеет не только научный интерес, но является полезным и для практических отраслей микологии. Наблюдение за поведением клеточных органелл может нести контрольную службу в процессах ферментации или борьбы с патогенами, позволяя прогнозировать или подтверждать направление процессов обмена гриба в сторону либо стимуляции, либо угнетения как общего развития, так и интересующего обменного шунта. Изыскания в области стимуляции развития органелл, являющихся материальной основой обменных процессов, должны приводить к улучшению этих процессов в целом и их регулированию. Именно в этой форме представлял себе дальнейшее развитие подобного направления исследований их зачинатель М. Н. Мейсель (1950).

- Авиженис В. Ю., Савицкайте И. М. Некоторые свойства протеолитических ферментов препарата «Оризин ПК»//Тр. АН ЛитССР. 1969. Т. 2, № 49. С. 181.
- Айзенберг В. Л., Билай В. И. О методах первичного отбора пектолитически активных культур микроскопических грибов//Биологически активные вещества микроорганизмов. Кишинев, 1970. С. 65.
- Акименко В. К., Андреева Н. А., Кулаев И. С. и др. О взаимосвязи между синтезом энинамина, пулом АТФ и цитохромоксидазным дыханием у *Fusarium sambucinum*//Микробиол. 1981. Т. 50, № 2. С. 205.
- Андеркофлер Л. А. Производство и применение растительных и микробных протеаз//Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963а. С. 48.
- Андеркофлер Л. А. Глюкозооксидаза, ее производство, свойства и возможные способы применения//Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963б. С. 73—85.
- Андреева С. М. Содержание бетанинов в высших грибах//Микол. и фитопатол. 1967. Т. 1, № 6. С. 492.
- Андреева Н. А., Егоров Н. С., Ушакова В. И. Влияние некоторых ингибиторов на протеолитические ферменты, образуемые *Penicillium lilacinum* Thom в связи с их фибринолитической активностью//Микробиол. 1972. Т. 41, № 3. С. 417.
- Андреева Г. В., Максимова Р. А., Корукова А. А., Пальмова Н. П. Фибринолитическая активность *Trichothecium roseum* Link//Докл. АН СССР. 1968. Т. 179, № 2. С. 454.
- Афанасьева Т. П., Филиппович С. Ю., Крицкий М. С. Удельная активность и молекулярные формы НАД-киназы в онтогенезе *Neurospora crassa*//Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18, № 3. С. 376.
- Баифилд Ф. Х. Приготовление, свойства, испытания пектинрасщепляющих ферментов//Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963. С. 35—47.
- Беккер З. Э. Возрастные явления у *Penicillium chrysogenum* Thom. Дис... д-ра биол. наук. М., 1956.
- Беккер З. Э. Физиология грибов и их практическое использование. М., 1963. С. 267.
- Беккер З. Э. Терпеновый обмен грибов из родов *Trichothecium* и *Arthrobotrys* и гипотеза механизмов хищничества и микопаразитизма//Изв. АН ТССР. Сер. биол. наук. 1972. Т. 6. С. 28—33.
- Беккер З. Э. О конвергентных чертах сходства грибов с некоторыми группами животных//Ж. общ. биол. 1973. Т. 36, № 5. С. 670.
- Беккер З. Э. Токсины и амины грибов, их эколого-физиологическая роль и дальнейшие перспективы фитопатологии//Эколого-физиологические методы в борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника. Ашхабад, 1977. Сб. 3. С. 187.
- Беккер З. Э., Дмитриева С. В., Супрун Т. П. и др. О связи аномального морфогенеза конидиеносцев с обменом нуклеопротеидов//Микол. и фитопатол. 1972. Т. 6, № 2. С. 105.
- Беккер З. Э., Полетаева В. Ф. Роль цинка в патогенезе фузариозного вилта и в биосинтетической активности штаммов его возбудителя//Изв. АН ТССР. Сер. биол. наук. 1968. Т. 2. С. 3.
- Беккер З. Э., Полетаева В. Ф. Противовилтовый эффект цинка и кобальта при раздельном и комбинированном применении и его механизмы//Эколого-

- физиологические методы в борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника. Ашхабад, 1971. Сб. 1. С. 129.
- Беккер З. Э., Пушкарева И. Д. Онтогенез мицелия и трансформация ядерного аппарата при развитии возбудителя фузариозного вилта в погруженной культуре//Эколого-физиологические методы в борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника. Ашхабад, 1973. Сб. 2. С. 59.
- Беккер З. Э., Чадова Ж. С. Механизмы адаптации к паразитизму и ядерные циклы возбудителя фузариозного вилта хлопчатника//Эколого-физиологические методы в борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника. Ашхабад, 1973. Сб. 2. С. 38.
- Белозерский А. Н., Кулаев И. С. Проблемы эволюционной биохимии. М., 1964. С. 190.
- Бехтерева М. Н. Биосинтез и метаболизм липидов у микроорганизмов//Тез. докл. II Всесоюз. конф. микробиологов. М., 1979.
- Бехтерева М. Н., Феофилова Е. П., Сергеева Л. Н. и др. Влияние фактора β - (триспоровых кислот) на образование каротиноидов минус-штамма *Blakeslea trispora*//Микробиол. 1969. Т. 38, № 3. С. 397.
- Бехтерева М. Н., Яковлева М. Б. О жирно-кислотном составе фосфолипидов некоторых видов грибов семейства Choapherphogaseae//Микробиол. 1980. Т. 49, № 5. С. 827.
- Билай В. И., Коваль Э. З. Рост грибов на углеводородах нефти. Киев, 1980. С. 79.
- Бобкова Т. С. Влияние углеродного и азотного состава среды на рост и синтез каротиноидов *Sporobolomyces roseum* штамм 362//Прикл. биохим. и микробиол. 1965. Т. 1, № 4. С. 426.
- Боннер Д. Молекулярная биология развития. М., 1967. С. 293.
- Борисова В. Н., Двойиос Л. М. Влияние некоторых субстратов пироксидного окисления на пероксидазную активность грибов, выделенных с элементов лесной подстилки//Микол. и фитопатол. 1972. Т. 6, № 2. С. 152.
- Борукаева М. Д. Сравнительное изучение биосинтеза биотина, инозита и никотиновой кислоты культурами *Candida* в зависимости от источника углерода//Микробиол. 1967. Т. 36, № 4. С. 576.
- Вагнер Р., Митчел Г. Генетика и обмен веществ. М., 1968. 118 с.
- Васильева К. В., Метлицкий Л. В. Трансэлиминативный распад пектиновых веществ, вызываемый ферментом *Verticillium dahliae* Kleb.//Докл. АН СССР. 1968. Т. 179, № 2. С. 216.
- Васильева К. В., Метлицкий Л. В., Озарецковская О. Л. Биохимия устойчивости растений к трахеомикозным заболеваниям//Фитоиммунитет. М., 1968. С. 79.
- Вечер Л. С., Куликова А. Н. Изменение полиеновых соединений на различных стадиях развития *Rhodotorula gracilis*//Микробиол. 1968. Т. 37, № 4. С. 676.
- Голышева М. Г., Жданович Е. С., Либбер Л. И. Получение флавиноадеин-динуклеотида микробиологическим методом с помощью культуры *Erethothecium ashbyii*//Вопр. мед. химии. 1963. Т. 9, № 4. С. 371.
- Громов Б. В., Мамкаева К. А. Ультраструктура зооспор *Aphelidium chlo-roccoscarum* Fott.//Микол. и фитопатол. 1975. Т. 9, № 3. С. 190.
- Гудвин Т. Сравнительная биохимия каротиноидов. М., 1954.
- Гудвин Т. Биосинтез каротиноидов//Тр. 5-й Междунар. биохим. конгр. Симпоз. VII, АН СССР. М., 1962. С. 302.
- Датунашвили Е. Н., Ежов В. Н., Воробьева Е. В. и др. Стабилизация вин с помощью ферментной обработки//Виноделие и виноградарство СССР. 1976. Т. 7. С. 14.
- Девдарнани Т. Г., Айзенберг В. Л., Билай Т. И. и др. Пектолитические ферменты, образуемые микромицетами *Penicillium* и *Fusarium*//Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18, № 2. С. 207.
- Девис Д., Джованелли Дж., Рис Т. Биохимия растений. М., 1966. С. 155.
- Дедюхина Э. Г., Бехтерева М. Н. Соотношение отдельных классов липидов, синтезируемых *Blakeslea trispora*, в динамике развития в связи с каротиногенезом//Микробиол. 1968. Т. 37, № 2. С. 245.

- Дедюхина Э. Г., Бехтерева М. Н. Образование липидов *Blakeslea trispora* в зависимости от состава питательной среды//Микробиол. 1969. Т. 38, № 5. С. 775.
- Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982. Т. 1, 2, 3. С. 960.
- Дмитриева С. В. Цитологический анализ развития штаммов-продуцентов пенициллина в глубинной культуре при различных концентрациях фосфора и серы в среде//Антибиотики. 1967. № 8. С. 647.
- Дмитриева С. В., Беккер З. Э. О природе валютинных гранул у *Penicillium chrysogenum*//Цитология. 1962. Т. 4. С. 691.
- Егоров Н. С., Ландау Н. С. Влияние различных концентраций глицерина и источников азота на биосинтез фибринолитического вещества культурой *Aspergillus oryzae* штамм МГУ//Прикл. биохим. и микробиол. 1965. Т. 1, № 5. С. 487.
- Егоров Н. С., Ушакова В. И., Андреева Н. А. Выделение и изучение некоторых свойств протеолитических ферментов, образуемых *Penicillium lilacinum* Thom./Прикл. биохим. и микробиол. 1972. Т. 8, № 6. С. 854.
- Егоров Н. С., Ушакова В. И., Прудлов Б. Изучение образования протеолитических ферментов несовершенными грибами родов *Cladosporium*, *Fusarium* и *Alternaria* в связи с их фибринолитической активностью//Микробиол. 1971. Т. 40, № 6. С. 604.
- Ерохин В. В., Филиппенко Л. Н. Мембрана, живущая вне клетки//Природа. 1981. Т. 10. С. 32.
- Жданова Н. Н. Изучение биологической роли меланиновых пигментов у грибов семейства Dematiaceae в связи с их экологией: Дис. д-ра биол. наук. Киев, 1976.
- Жданова Н. Н., Василевская А. И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. Киев, 1982. С. 47—93.
- Жданова Н. Н., Рожко И. И., Каневец Л. Г. Усвоение радиоактивного углерода из уголекислоты воздуха грибом *Cladosporium* sp. 73-М на свету и в темноте//Микол. и фитопатол. 1985. Т. 19, № 2. С. 132.
- Запрометова О. М., Улезло И. В., Ильина И. В., Безбородов А. М. Получение и свойства препарата α -галактозидазы из *Cephalosporium* зр. штамм 237//Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18, № 3. С. 401—404.
- Зеленева Р. Н., Максимова Р. А., Силаев А. Б. Липиды гриба *Trichothecium roseum* Lk. ex Fr./Прикл. биохим. и микробиол. 1979. Т. 15, № 3. С. 389.
- Иванов Н. И. Образование и превращение мочевины в грибах//Материалы по микологии и фитопатологии. 1928. Т. 7. С. 23.
- Иванов Н. Н., Цветкова Н. Е. Новые достижения по биохимии грибов//Успехи биол. химии. 1936. В. 20. С. 36.
- Ильченко А. П., Мауэрсбергер С., Матяшова Р. Н., Лозинова А. Б. Индукция цитохрома Р-450 при росте дрожжевых организмов на различных субстратах//Микробиол. 1980а. Т. 49, № 3. С. 452.
- Ильченко А. П., Соколов Г. В. Влияние ингибиторов микросомального гидроксирования на эндогенное дыхание клеток *Torulopsis candida*//Микробиол. 1980б. Т. 49, № 5. С. 664.
- Имшенецкий А. А., Брочкая С. З., Коршунов В. В. О действии протенназ плесневых грибов на тромбы крови//Докл. АН СССР. 1965. Т. 163, № 3. С. 737.
- Имшенецкий А. А., Брочкая С. З. Сравнительная активность фибринолизина и тромболизина//Прикл. биохим. и микробиол. 1967. Т. 3, № 5. С. 601.
- Иост Х. Физиология клетки. М., 1975. Рис. 256. С. 50.
- Камалетдинова Ф. И., Васильев Л. Е. Цитология дисккомицетов. Алма-Ата, 1982. С. 168.
- Караваева Н. Н., Мухитдинова Н. Г. Действие протеазы гриба *Torula termophila* на тромбы крови//Экологии, физиологии и изменчивость микроорганизмов. Ташкент, 1976. С. 77.
- Кац Л. Н. Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1964.
- Килер Р., Вернер Дж. Обмен молибдена и вольфрамата у *Azotobacter*//Микроэлементы. М., 1962. С. 386.

- Кишковский З. Н., Калунянц К. А., Рохленко С. Г. Применение пектолитических ферментных препаратов при получении вина из крыжовника и черной смородины//Виноделие и виноградарство СССР. 1974. Т. 7. С. 21.
- Ковальчук Л. П., Донец А. Т., Бурцева С. А. и др. Жирные кислоты фосфолипидов актиномицетов//Микробиол. 1980. Т. 49, № 5. С. 746.
- Кожински Т., Ковшик-Гиндифер З., Курилович В. Антибиотики. Происхождение, природа и свойства. Варшава, 1969. С. 902.
- Колот Ф. Б. Исследование по биосинтезу β -каротина грибами: Дис... канд. биол. наук. М., 1969.
- Колот Ф. Б., Вакулова Л. А., Веселов И. Я., Самохвалов Г. И. Стимуляция каротиногенеза в смешанной культуре *Blakeslea trispora* изопреноидами и другими соединениями//Прикл. биохим. и микробиол. 1969. Т. 5, № 3. С. 304.
- Коршунов В. В. Выделение и очистка протеназы *Aspergillus terricola*//Прикл. биохим. и микробиол. 1965. Т. 1, № 6. С. 6.
- Коршунов В. В. Получения и свойства протениазы *Aspergillus terricola*//Микробиол. 1969. Т. 38, № 2. С. 238.
- Корякина Л. Н. Грибы из порядка гастеромидеов, афиллофоровых и агариковых как источники холина//Микол. и фитопатол. 1967. Т. 1, № 6. С. 496.
- Кохрейн А. Л. Инвертаза, ее производство и применение//Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963. С. 27.
- Кретович В. Л. Обмен азота в растениях. М., 1972. 151 с.
- Крицкий М. С. Фосфорный обмен в плодовых телах шампиньонов. Дис... канд. биол. наук. М., 1965.
- Кудряшов Б. А., Андреев Г. В., Егоров Н. С. и др. Фибринолитические агенты, выделяемые из культур некоторых сапрофитных грибов//Докл. АН СССР. 1963. Т. 153, № 4. С. 939.
- Кулаев И. С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. М., 1975. 225 с.
- Курицна Д. С. Плесневые грибы, разрушающие древнерусскую стенную живопись, и борьба с ними//Вестн. Моск. ун-та. Сер. VI, Биол. 1968. Т. 3. С. 145.
- Курсанов Л. И. Морфологические и цитологические исследования в группе *Uredinales* (магистерская диссертация)//Учен. зап. ИМУ, отд. естественно-исторический. 1915. Т. 36. С. 1.
- Курсанов Л. И. Микология. М., 1940. С. 70.
- Лендджер А. Биохимия. М., Мир, 1974. С. 266—502.
- Либберт Э. Физиология растений. М., Мир. 1975. С. 553.
- Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. М., ИЛ. 1953. С. 220—279.
- Логинова Л. Н., Цапина И. А., Храпунова Г. И., Гужова Э. П. Разрушение тканей листьев растений при воздействии микробных ферментов//Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16, № 6. С. 848.
- Локвуд А. Р. Производство грибной амилазы и ее применение в хлебопечении//Сб. Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963. С. 17—23.
- Львов Н. П., Бурханов Ш. С., Кретович В. А. Взаимоотношение нитрогеназы и нитратредуктазы в клетках азотфиксаторов//Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16, № 6. С. 805—818.
- Лях С. П., Рубан Е. А. Микробные меланины. М., 1972.
- Мак Кеина Г., Львов Н. П., Гамелин В. Л. и др. О существовании низкомолекулярного фактора, общего для различных Мо-содержащих ферментов//Докл. АН СССР. 1974. Т. 2. С. 217.
- Максимова Р. А., Пальмова Н. П. Изучение ядер в конидиях *Trichothecium roseum* Link//Микробиол. 1969. Т. 38, № 4. С. 674.
- Максимова Р. А., Пеннер Л. Ф., Минаева Т. А. Образование каротиноидных пигментов несовершенным грибом *Trichothecium roseum* Link. ex Fr.//Биол. науки. 1973. Т. 6. С. 92.
- Мансурова С. Э. Изучение кислоторастворимых нуклеотидов *Penicillium chrysogenum* q-176: Дис... канд. биол. наук. М., 1966.
- Маслова Р. А. Свободные и связанные аминокислоты некоторых афиллофоровых грибов//Микол. и фитопатол. 1978. Т. 12, № 4. С. 292.

- Маттисон Н. А. Изучение протеолитических и окислительных ферментов культуры *Penicillium chrysogenum*. Дис... канд. биол. наук. Л., 1956.
- Мауэрсбергер С., Матяшова Р. К. Содержание цитохрома Р-450 в клетках дрожжей при росте на гексадекане//Микробиол. 1980. Т. 49, № 4. С. 571.
- Мацкевич Н. В. Спонтанная и экспериментальная полиплоидия и ануоплоидия в формообразовании и онтогенезе грибов//Теоретические и практические проблемы полиплоидии. М., 1974. С. 41.
- Мацкевич Н. В., Головин М. В. Полиплоидия в онтогенезе вегетативных популяций дрожжевых грибов//Полиплоидия и селекция. Тр. Всесоюз. совещ., М., 1963. С. 156.
- Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. М.; Л., 1950. С. 323.
- Мецлер Д. Биохимия. М., 1980. Т. 2. С. 595.
- Микельсаар Н. Гипотетическая схема минимального дыхательного ансамбля митохондрий//Митохондрии. Молекулярные механизмы ферментативных реакций. М., 1972. С. 49.
- Милюко А. А., Белякова Л. А. Род *Choanephora* Currey (Mucorales)//Микробиол. 1969. Т. 38, № 5. С. 894.
- Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. М., 1976. С. 163.
- Михайлова Р. В., Лобанюк А. Г., Фоменко Т. Н. и др. Свойства пектиндеполимеразы *Penicillium digitatum* и использование препаратов различного свойства для мацерации тканей картофеля//Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18, № 3. С. 367.
- Мухитдинова Н. Г., Караваева Н. Н. Получение протеазы гриба *Torula thermophila* на стендовой установке//Тез. докл. I респ. науч.-техн. конф. молодых ученых-микробиологов. Ташкент, 1976. С. 37.
- Насон А. Роль ванадия и молибдена в обмене веществ//Микроэлементы. М., 1962. С. 350.
- Нюкша Ю. П. Воздействие грибов на бумагу//Микол. и фитопатол. 1969. Т. 3, № 5. С. 463.
- Окоороков Л. А., Сысуев В. А., Терехова В. А., Дьяков Ю. Т. Влияние ионов кальция на рост *Phytophthora infestans*//Микол. и фитопатол. 1976. Т. 10, № 6. С. 484.
- Олнфсон Л. Е. Токсические вещества, выделенные из злаковых культур, перезимовавших в поле, и их химическая природа//Вестн. Оренбургск. отд. ВХО им. Менделеева. 1957. Т. 7. С. 21—35.
- Плотникова Ю. М., Сассен М. М. Ультраструктура *Puccinia striiformis* West., паразитирующей в тканях пшеницы//Микол. и фитопатол. 1974. Т. 8, № 1. С. 12.
- Полетаева В. Ф. Влияние кобальта на заболевание хлопчатника фузариозным вилтом//Изв. АН ТССР. Сер. биол. наук. 1969. С. 3.
- Попова Н. И., Бехтерева М. Н., Галаина Л. А. Изменение жирнокислотного состава фосфолипидов в процессе развития микроскопических грибов семейства *Choanephoraceae*//Микробиол. 1980. Т. 49, № 5. С. 734.
- Прескотт С., Дэн С. Техническая микробиология. М. 1968. С. 265.
- Прудлов Б., Ушакова В. И., Егоров Н. С. Влияние различных соединений углерода на образование протеолитических ферментов *Fusarium graminearum* и *Alternaria* sp.//Микробиол. 1972. Т. 41, № 5. С. 791.
- Пушкарева И. Д., Беккер З. Э. Ядерная активность и локализация защитных систем против вилта в растении хлопчатника//Эколого-физиологические методы в борьбе с фузариозным вилтом хлопчатника. Ашхабад. 1973. Сб. 2. С. 206.
- Пыстина К. А. Влияние стеролов и растительных масел на рост и половую репродукцию грибов из рода *Pythium* Pringsh.//Микол. и фитопатол. 1973. Т. 7, № 6. С. 493.
- Раджабова А. А., Мехтиева Н. А., Бехтерева М. Н. и др. Состав липидов некоторых видов хищных грибов рода *Arthrobotrys*//Микробиол. 1980. Т. 49, № 5. С. 740.

- Решетникова И. А., Успенская Г. Д. Амилолитические ферменты грибов рода *Ascochyta* Lib. и *Phoma* Fr.//Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16, биол. 1981. N 2. С. 38.
- Рипачек В. Биология дереворазрушающих грибов. М., 1967. С. 102.
- Ролан Ж. К., Сёлоши А., Сёлоши Д. Атлас по биологии клетки. М., 1978. С. 27.
- Рубан Е. А., Лобырева Л. Б. Влияние аналогов триптофана на биосинтез L-триптофана *Hansenula anomala* 315-2Л//Микробиол. 1967. № 3. С. 565.
- Самсонов Г. В., Шатаева Л. Н., Орлиевская О. В. Физико-химические и энзиматические свойства протеазы из гриба *Aspergillus terricola*//Докл. АН СССР. 1972. Т. 206. № 2. С. 497.
- Согдиева М. Г., Васильева К. В. Влияние различных факторов на продуцирование пектолитических ферментов *Verticillium dahliae*//Микол. и фитопатол. 1975. Т. 9, № 5. С. 400.
- Стайченко Н. И., Федоров Н. И. Целлюлитическая активность ложного осинового трутовика//Докл. АН БССР. 1969. Т. 13, № 10. С. 946.
- Степанова В. Н. Изучение биохимических свойств трихолизина — протеолитического комплекса *Trichothecium roseum*. Дис... канд. биол. наук. М., 1977.
- Струкова С. М. Тромболитический препарат из культуры гриба *Aspergillus oryzae*: получение, очистка и некоторые свойства. Дис... канд. биол. наук. М., 1965.
- Сысуев В. А. Транспорт ионов кальция в клетки гриба *Phytophthora infestans*. Дис... канд. биол. наук. Пушкино, 1979.
- Сысуев В. А., Холоденко В. П., Окороков Л. А. Транспорт аминокислот и его сравнение с транспортом кальция у гриба *Phytophthora infestans*//Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1014.
- Тарасов К. Л. Изучение возможных родственных связей формального рода *Acronium* Link. ex Fr.: Дис... канд. биол. наук. М., 1976.
- Телесина Г. Н., Бартошевич Ю. Э., Крахмалева И. Н. и др. Возможная роль дыхательной системы *Fusidium coccineum* в регуляции биосинтеза фузидиновой кислоты//Микробиол. 1980. Т. 49, № 4. С. 493.
- Теплякова Т. В. Хищные грибы Новосибирской области и особенности их организации и поведения в связи с изменчивостью нематодцидных свойств: Дис... канд. биол. наук. М., 1977.
- Тиунова Н. А., Зайкина И. В., Участвова Л. Н. и др. β-глюканазы *Geotrichum candidum*//Микробиол. 1982. Т. 51, № 3. С. 510.
- Торев А. К. Промышлена технология за производство на мицел от висши гъбы. София, 1975.
- Трутко С. М., Мезенцев А. Г., Акменко В. К. Влияние дефицита серы, меди и железа на развитие диамидрезистентного дыхания и цитохромный состав у *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida lipolytica*//Микробиол. 1980. Т. 49, № 5. С. 657.
- Улезло И. В., Запрометова О. М., Безбородов А. М. Продуценты а-галактозидазы среди дрожжевых культур//Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16, № 3. С. 347.
- Усольцева Н. В., Усольцева В. А. Жидкокристаллическое состояние и метаболизм//Природа. 1980. Т. 2. С. 56.
- Фениксова Р. В., Молдабаева Р. К. Влияние источников углерода в среде на синтез пектолитических ферментов в глубинной культуре *Aspergillus niger*//Прикл. биохим. и микробиол. 1967. Т. 3, № 3. С. 283.
- Фениксова Р. В., Шилова А. А. Амилолитические ферменты плесневого гриба *Aspergillus awamori*//Ферментная и спиртовая промышленность. 1964. Т. 5. С. 6.
- Феофилова Е. П., Терешина В. М., Иванова Н. В. и др. Физико-химические свойства хитина крабов и некоторых микроскопических грибов//Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16, № 3. С. 377.
- Фостер Д. Химическая деятельность грибов. М., 1950. С. 550.
- Фрей-Висслинг А. Сравнительная органеллография цитоплазмы. М., 1976. С. 56.
- Хакимова Л. К. Ядерный аппарат возбудителя пирикулярноза риса в онтогенезе: Дис... канд. биол. наук. М., 1971.

- Хакимова Л. К., Мочалкина А. О., Мацкевич Н. В. Ультратонкое строение гриба *Piricularia oryzae* Briosi et Cav.//Микол. и фитопатол. 1974. Т. 8, № 5. С. 405.
- Хохряков М. К., Беккер З. Э., Дудка И. А., Нюкша Ю. П. Работа микологической секции XII Международного ботанического конгресса//Микол. и фитопатол. 1976. Т. 10, № 3. С. 240.
- Чарли В. А. С. Применение ферментов при обработке и хранении соков и других продуктов//Производство и применение ферментных препаратов в пищевой промышленности. М., 1963. С. 106.
- Шатин В. Н. Кератинофильные грибы ленинградских почв и их совершенное плонодошение//Сборник научных работ аспирантов ГИУВ им. Кирова. Л., 1964. Т. 40. С. 246.
- Шиврина А. Н. Биологически активные вещества высших грибов. М., 1965. С. 164.
- Элсашвили В. И., Лойцянская М. С., Баранова Т. И., Бангура А. О леваназе *Fusarium solani* 68//Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16, № 3. С. 342.
- Ягодни Б. А. Кобальт в жизни растений. М., 1970. 127 с.
- Яровенко В. А., Устинников Б. А. Ферментные препараты в пищевой промышленности//Применение ферментных препаратов в спиртовой промышленности. М., 1975. С. 412.
- Adair E. I., Vishniac H. S. Marins fungous requiring vitamin B₁₂//Science. 1958. Vol. 127. P. 147.
- Airth R. J., Forster G. E., Behrens P. Q. The luminous fungi//Bioluminescence in progress. Proc. of the Luminescence Conference. 1966. Princeton. New-Jersey. P. 203.
- Agnihotri V. P. Studies on aspergilli. VII//Lloydia. 1962. Vol. 25, N 2. P. 94.
- Agnihotri V. P. Studies on aspergilli. XVII//Mycopathol. et mycol. appl. 1966. Vol. 30, N 3—4. P. 245—252.
- Alexopoulos C. J. Introductory Mycology. N.—Y., 1962. 613 p.
- Allport D. C., Bu'Lock J. Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*//J. Chem. Soc. 1960. T. 134. C. 654.
- Ander P., Eriksson K. E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*//Arch. Microbiol. 1976. Vol. 109. P. 1.
- Andreenko G. W., Silaev A. B., Maksimova R. A. et al. Fibrinolytische und thrombolytische Wirkung von Proteasen einiger Pilzkulturen//Folia Haematologica. Leipzig. 1974. Vol. 101, N 1. P. 14.
- Aronson J. M. The Cell Wall//The Fungi/Ed. by C. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London. Vol. 1. P. 49.
- Ashour W. E. Pectinase production by *Botrytis cinerea* and *Pythium debarium*//Trans. Brit. Mycol. Soc. 1954. Vol. 37, N 4. P. 343.
- Aurich H. Der Aminosäure-Pool von *Neurospora*. Veränderungen unter dem Einfluss exogener Faktoren//A. von Loewenhoeck J. Microbiol. and Serol. 1966. Vol. 32, N 3. P. 229.
- Ayers W. A., Papavizas G. C., Diem A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*//Phytopathology. 1966. 9106—1011. Vol. 56. P. 9106.
- Barby R. T., Simmons E. G., Wiley B. J. A survey of fungi in military aircraft fuel supply systems//Intern. Biodet. Bull. 1968. Vol. 4, N 1. P. 35.
- Becker Z. E. Mechanisms of fungicidal action of antibiotics and some fungicides//First Inter. Conf. of Plant Pathology. London, 1968. P. 10.
- Bell M. K., Burnett J. H. Cellulase activity of *Polyporus betulinus*//Ann. Appl. Biol. 1966. Vol. 58, N 1. P. 123.
- Bell A. A., Puhalla J. E., Tolmsoff J. W., Stipanovic R. D. Use of mutants to enhance (+)-scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*//Canad. J. Microbiol. 1976. Vol. 22. P. 787.

- Bell A. A., Stipanovic R. D., Puhalla J. E. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. Identification of (+)-scytalone as natural precursor to melanin//Tetrahedron. 1976. Vol. 32. P. 1352.
- Berndt H., Liese W. Untersuchungen über die Enzyme von Blauepilzen. III//Arch. Microbiol. 1971. Vol. 79. P. 140.
- Bertrand D., de Wolf A. Premières recherches sur le rôle de l'oligo-élément zinc chez *Aspergillus niger*//IV Inter. Kongr. für Biochemie. Wien, 1958. P. 134.
- Bertrand D., de Wolf A. Sur la nécessité du Zinc comme oligoélément pour la synthèse de la tyrosine par *Aspergillus niger*//Compt. Rend. des sciences de l'Acad. des Sciences. 1960. Vol. 250, N 17. P. 2951.
- Bertrand D., de Wolf A. Sur la nécessité du zinc comme oligoélément pour la synthèse des quelques aminoacides chez *Aspergillus niger*//Compt. Rend. de l'Académie des Sciences. 1961. Vol. 253, N 13. P. 1342.
- Blumenthal H. J. Carbohydrate metabolism//The Fungi. 1965. New York—London. P. 229.
- Blumer G. S., Li-Yu-Ten. Enzymic activities in *Clavatia cyathiformis* during and after meiosis//Mycologia. 1966. Vol. 58, N 4. P. 555.
- Borris R. Exoenzymbildung von Mikroorganismen//Biol. Rundschau. 1981. Vol. 19, N 4. P. 204.
- Brenner D. M., Carroll G. C. Fine-structural correlates of growth in hyphae of *Ascosdesmia sphaerospora*//J. Bacteriol. 1968. Vol. 95, N 2. P. 658.
- Brody S., Martins S. A. Circadian rhythms in *Neurospora*//The Molecular Basis of Circadian Rhythms. Berlin, 1976. P. 245.
- Brown D. H., Cappelini R. A., Price C. A. Actinomycin D inhibition of the zinc-induced formation of cytochrome C in *Ustilago*//Plant physiol. 1966. Vol. 41, N 9. P. 1543.
- Bu'Lock J. D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis//Advances of appl. microbiol. 1961. Vol. 3. P. 293.
- Burnett J. H. Fundamentals of mycology. London, 1968. P. 493.
- Ciusa W., Barbiroli G. Recherche sulla transmetilasi//Acta vitaminologica. 1962. Vol. 16, N 1. P. 23.
- Clare B. G., Zentmeyer G. A. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*//Phytopathology. 1966. Vol. 58, N 118. P. 1334.
- Clarke D. D. Production of pectic enzymes by *Phytophthora infestans*//Nature. 1966. Vol. 211. P. 5049.
- Cochrane V. W. Physiology of fungi. N. Y. 1958. P. 145, 241.
- Cotter D. A., Raper K. B. Spore germination in *Dictyostelium discoideum*//Pros. Nat. Acad. Sci. USA. 1966. Vol. 56, N 3. P. 880.
- Davies J. S., Wellman A. M., Zajic J. E. Oxidation of Ethanol by an *Acronium species*//Appl. and Environmental Microbiol. 1976. Vol. 32, N 1. P. 14.
- Dimond A. E., Waggoner P. H. The physiology of lycoramine production by *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici*//Phytopathology. 1955. Vol. 43, N 4. P. 195.
- Ehringer L. Die Möglichkeit eines Ersatzes von Thiamin durch Bacitracin bei *Phycomyces blakesleanus*//Naturwissenschaften. 1960. Vol. 47. P. 210.
- Eggs H. C. W., Coursey D. G. The industrial significance of the biodegradation of oilseed//Inter. Biodegrad. Bull. 1968. Vol. 4, N 1. P. 29.
- Fanelli C., Cacace M. G., Cervone F. Purification and properties of two polygalacturonases from *Trichoderma koningii*//J. Gener. Microbiol. 1978. Vol. 104, N 2. P. 305.
- Ferris J. P., MacDonald T. H., Patricu M. A., Martin M. A. Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in the Fungus *Cunninghamella bainieri*. Evidence for the Presence of Cytochrome P-450//Arch. Biochem. and Biophys. 1976. Vol. 175, N 2. P. 443.
- Flegler S. L., Hooper G. R., Fields W. G. Ultrastructural and cytochemical changes in the basidiomycete dolipore septum associated with fruiting//Canad. J. Botany. 1976. Vol. 54, N 19. P. 2243.
- Fries N. Effect of certain nucleic acid constituents on the growth of some higher fungi//Nature. 1951. Vol. 168. P. 1045.

- Fries N. The response of some Hymenomycetes to constituents of nucleic acid//*Svensk. bot. Tidskr.* 1954. Vol. 48, N 2. P. 559.
- Fries N. The chemical environment for fungal growth//*The fungi*. 1/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London. 1965. Vol. 1. P. 491.
- Fries N., Källströmer L. A requirement for biotin in *Aspergillus niger* when grown on a rhamnose medium at high temperatures//*Physiol. Plantarum*. 1965. Vol. 18. C. 191.
- Gallinet J. P. Mitochondria of higher fungi composition of respiratory-chain of *Agaricus campestris* (Fr.) var. *bisporus*//*C. R. Acad. Sc. Paris*, 1974. Vol. 277. Ser. D. P. 2693.
- Gallinet J. P. Les mitochondries des champignons superieurs: les cytochromes b des mitochondries d'*Agaricus campestris* (Fr.) var. *bisporus*//*C. R. des sciences de la Société de biologie*. 1976. Vol. 170. P. 1009.
- Gäumann E. Die Pilze. Basel. 1949. P. 383.
- Girbardt M. Licht- und elektronmikroskopische Untersuchungen an *Polystictus versicolor*. VIII//*Planta*. 1962. Bd. 58. S. 1.
- Gomez-Miranda B., Leal J. A. Influencia del esteroles, luz y fluente de nitrogeno on la reproduction asexual de *Phytophthora* y *Pythium*//*Microbiol. esp.*, 1965. Vol. 18, N 3—4. P. 235.
- Goodman J. J., Ferrera R. R. Synthesis of riboflavin by *Ashlya gossypii* grown in a synthetic medium//*Mycologia*. 1954. Vol. 46, N 5. P. 556.
- Gull R. Form and function of septa in filamentous fungi//*The filamentous fungi*. 3/Ed. by J. E. Smith and D. R. Berry. London, 1978. Vol. 3. P. 79.
- Hasegawa T., Banno J. Vitamin requirement as a taxonomic key for *Rhodotorula* sp.//*J. Gener. Appl. Microb.* (Tokyo). 1963. Vol. 9. P. 279.
- Hiroi T., Eriksson K. E. Microbial degradation of lignin. I//*Svensk. Papperst.* 1976. Vol. 5. P. 157.
- Hofmann A., Heim R., Brack A., Kobel H. Psilocybin, ein psychotroper Wirkstoff aus dem mexikanischen Rauschpilz *Psilocybe mexicana* Heim//*Experimentia*. 1958. Vol. 14, N 3. P. 107.
- Horsfall J. G., Lukems R. J. Selectivity of fungicides//*The Connecticut Agric. Exptl. Station*. New Haven. 1966. P. 676.
- Ichishima E., Yoshida F. Molecular weight and amino-acid composition of acid proteinase of *Aspergillus saitoi*//*Biochim., Biophys. acta*. 1965. Vol. 110. P. 155.
- Ichishima E., Yoshida F. N- and C-terminal residues in the acid proteinase of *Aspergillus saitoi*//*J. Biochem.* 1966. Vol. 59. P. 183.
- Isaac S., Ryder N. S., Peberdy J. F. Distribution and activation of chitin synthase in protoplast fraction released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae//*J. Gener. Microbiol.* 1978. Vol. 105, N 1. P. 45.
- Jennison M. W., Newcomb M. D., Henderson R. Physiology of the wood-rotting Basidiomycetes//*Mycologia*. 1955. Vol. 47. P. 275.
- Jermyn M. A. Fungal cellulases IV, V//*Austral. J. Biol. Sci.* 1956. Vol. 8, N 4. P. 541.
- Jermyn M. A. Ternary complexes in the action of a β -glucosidase//*IV Inter. Kongr. für Biochem.* Wien, 1958. Vol. 5. P. 44.
- Jezewska M. M. Biosyntheseza ukladu pterydynowago Flawinowago//*Postery biochem.* 1963. Vol. 9, N 4. P. 497.
- Johnson M. A comparison between the cellulolytic activity of white and brown rot fungi. I//*Physiol. Plantarum*. 1966. Vol. 19, N 3. P. 709.
- Kalyanasundaram R., Saraswathi-Devi L. Zink in metabolism of *Fusarium vasinfectum* Atk.//*Nature*. 1955. Vol. 175. P. 945.
- Kanda T., Nakanubo S., Wakabayashi K., Nisizawa K. Purification and properties of an exo-cellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*)//*J. Biochem.* 1978. Vol. 84. P. 1217.
- Kawai M. Mycolytic enzymes produced by some *Coprinus* strains. I, II//*J. Ferm. Technol.* 1970. Vol. 48. P. 295. P. 397.
- Kern H., Naef-Roth S. Zwei neue durch *Martiella-Fusarien* gebildete Napht-hasarin-Derivate//*Phytopathol. Zeitschrift*. 1967. Vol. 60. P. 316.
- Ketchum P. A., Cambier H. Y., Frazier W. A. et al. In vitro assembly of *Neurospora* assimilatory nitrate reductase from protein subunits of a *Neuro-*

- spora* mutant and xantine oxidasing or aldehyde systems of higher animals//*Pros. Nat. Acad. Sci. USA*. 1970. Vol. 6b. P. 1016.
- Ketchum P. A., Sevilla C. L. In vitro formation of nitrate reductase using extracts of nitrate reductase mutant of *N. crassa* nit-1 and *Rhodospirillum rubrum*//*J. Bacteriology*. 1973. Vol. 116. P. 600.
- Khan M. Substitution of light by indolil- β -acetic acid in the sporulation of *Sclerotinia fructigena*//*Nature*. 1966. Vol. 212. P. 640.
- Klein D. T., Klein R. M. Effects of antimetabolites of nucleic acid components on the growth of *Diplodia natalensis*. *Plant. Physiol.* 1955. Vol. 30, N 5. P. 410.
- Kostytschew S. P. Über die normale und anormale atmung bei Abwesenheit von Zucker//*Jahrb. für Wiss. Botanik*. 1904. Vol. 40. P. 22.
- Kulaev I. S., Mansurova S. E., Burlakova E. B., Duchovich V. E. Why ATP instead of pyrophosphate? Interrelation between ATP and pyrophosphate production during evolution and in contemporary organisms//*Bio-Systems*. North-Holland Scient. Publ. Ltd. 1980. Vol. 12. P. 177.
- Kumar R. P., Sreeleela N. S., Subba Rao P. V., Vaidyanathan C. S. Antranilate hydroxydase from *Aspergillus niger*: Evidens for the participation of iron in the double hydroxylation reaction//*J. of Bacteriol.* 1973. Vol. 113, N 3. P. 1213.
- Krnylowicz W., Kurzatkowski W., Woznicka W. et al. Atlas of Ultrastructure of *Penicillium chrysogenum* in Course of Biosynthesis of Penicillin. Warsaw, 1980. P. 40.
- Lamaison Y. Z. Interet chimiotaxonomique de l'equipment enzymatique des macromycetes//*Bull. Soc. Bot. France*. 1976. Vol. 123. P. 119.
- Liese W. Ultrastructural aspects of woody tissue desintegration//*Ann. Rev. of Phytopathology*. 1970. Vol. 8. P. 231.
- Liese W., Schmied R. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Abbau des Holzes durch Pilze//*Angew. Bot.* 1962. Vol. 36. P. 291.
- Lilly V. G., Barnett H. L. The utilisation of sugar by fungi. West. Va. Univ. Agric. Expt. Station Bull. 1953. Vol. 362. P. 58.
- Lilly V. G. Chemical constituents of the fungal cell//*The Fungi*/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London. 1965. P. 163.
- Lindenbergh G., Fähræus G. Nature and formation of phenol oxidases in *Polyporus zonatus* und *P. versicolor*//*Physiol. plant.* 1952. Vol. 5, N 2. P. 277.
- Lindenbergh O., Ernster L. Chemistry and physiology of mitochondria and microsomes//*Protoplasmologia*. 1954. Vol. III, N 4. P. 570.
- Lindenmayer A. Carbohydrate metabolism//*The Fungi*. 1965. New York—London. P. 301.
- List P. H. Basische Pilzenhaltsstoffe//*Planta Medica*. 1958. 6 Jahrb. N 4. P. 424.
- Littman M. L., Miwatani T. Effect of water soluble vitamins and their analogues on growth of *Candida albicans*. II//*Mycopathol. Mycol. Appl.* 1963. Vol. 21. P. 229.
- Lukens R. J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*//*Amer. J. Botany*. 1963. Vol. 50, N 7. P. 720.
- Lyr H. Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährboden. I. Pectin als C-Quelle//*Arch. Microbiol.* 1959a. Vol. 33. P. 266. II. Cellulose als C-Quelle//*Arch. Microbiol.* 1959b. Vol. 34, N 1. P. 189. III. Amylum als C-Quelle//*Arch. Microbiol.* 1959c. Vol. 34. P. 418.
- Lyr H. The effect of pentacklorphenol on metabolism and enzyme-production of some wood-rotting fungi//*Proc. IX Inter. Bot. Congr.* 1959. P. 155.
- Lyr H. Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährboden. V. Ein Komplexes Medium als C-Quelle//*Arch. Mikrobiol.* 1960. Vol. 35. P. 258.
- Lyr H. Hemmungsanalytische Untersuchungen an einigen Ektoenzymen holzzerstörender Pilze//*Enzymologia*. 1961. Vol. 22. P. 231.
- Lyr H. Vorcommen und Eigenschaften von Hemicellulasen bei Pilzen//*Inter. Symp. Eberswalde*, 1962, 155—162.

- Lyr H. Zur Charakterisierung der Pectinase von *Coniophora cerebella*//Arch. Mikrobiol. 1963. Vol. 45. P. 198.
- Lyr H. Über das Vorkommen von Mannanase bei Pilzen//Zeitschr. Allg. Mikrobiol. 1963. Vol. 3, N 1. P. 25.
- Lyr H., Novak E. Vergleichende Untersuchungen über die Bildung von Cellulasen und Hemicellulasen bei einigen Pilzen//Zeitschr. Allg. Mikrobiol. 1961. Vol. 2, N 2. P. 86.
- Lyr H., Schewe T., Müller W., Zanke D. Zum problem der Selektivität sowie der Struktur—Rezeptor—Beziehungen von Carboxin und seinen Analogen//System Fungizide, Inter. Symp. Reinhardtsbrunn. Berlin, 1975. P. 153.
- Lyr H., Ziegler H. Enzymausscheidung und Holzzabbau durch *Phellinus igniarius* Qurb. und *Collobia velutipes* Curt//Phytopath. Z. 1959. Vol. 35. P. 173.
- Machlis L., Craseman I. M. Physiological variation between the generation and among the strains of watermoulds in the subgenus *Euallomyces*//Amer. J. Bot. 1956. Vol. 43, N 8. P. 601.
- Macko V., Novacky A. Isozymasa of malate dehydrogenase in uredospores of *Puccinia recondita* Rob. ex Desem//Biologia (CSSR). 1966. Vol. 21, N 6. P. 460.
- Mandahar C. L. Nutritional studies on *Pleospora indica* (Tranden. and Bilgrani) Thind and Mandahar//Res. Bull. Panjab University. 1965. Vol. 16, N 4. P. 305.
- McKee W. E. Voronin bodies in *Erysiphe graminis*//D. C. Canad. J. Microbiol. 1971. Vol. 17, N 12. P. 1557.
- Medina A., Nicholas D. J. D. Metallo-enzymes in the reduction of nitrate to ammonia in *Neurospora*//Biochim. Biophys. Acta. 1957. Vol. 25. P. 138.
- Miller M. W. The Pfizer Handbook of microbial metabolites. New York—Toronto—London, 1961. P. 33.
- Moore R. T. The ultrastructure of fungal call//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 95.
- Morton A. G., McMillan A. The assimilation of nitrogen from ammonium salt and nitrate by fungi//J. Exp. Bot. 1954. Vol. 5, N 14. P. 232.
- Mover R. C., Storck R. Properties of ribosomes and RNA from *Aspergillus niger*//Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 104, N 2. P. 193.
- Murray G. M., Maxwell D. P. Ultrastructure and lipid identification during conidium germination of *Stemphylium sarcinaeforme*//Canad. J. Microbiol. 1976. Vol. 22, N 1. P. 92.
- Musilek V. Enzymatic activity of cultures of Basidiomycetes//Ceska Mycol. 1981. Vol. 35, N 4. P. 196.
- Musilkova M., Musilek V., Šašek V. Enzymatic lysis of fungal cell walls. IV Inter. Simp. on Yeast. Nottingham, 1975a. P. 42.
- Musilkova M., Musilek V., Šašek V. Release of Yeast spheroplasts by an enzyme complex from *Lycoperdon perlatum* Pers.//Ceska Mykol. 1975. Vol. 29. P. 153.
- Nabel K. Über die Membran niederer Pilze besonders von *Rhizidiomyces bivellatum* nov. spec.//Arch. Mikrobiol. 1939. Bd. 10. S. 515.
- Nečas O., Navelkova M., Sondek D. Submicroscopic morphology of *Rhizopus nigricans*//Folia microbiol. 1963, Vol. 8, N 5. P. 290.
- Nicholas D. J. D. Utilisation of inorganic nitrogen compounds and aminoacids by fungi//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 349—376.
- Nicholas D. J. D., Wilson P. N., Heinen W. The use of electron paramagnetic resonance spectroscopy in investigation of functional metal components in microorganisms//Nature. 1962. Vol. 196. P. 433.
- Nicot J., Zakartchenko V. Remarques sur la morphologie et la biologie du *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries//Rev. mycol. 1966. Vol. 31, N 1. P. 48.
- Niederpruem D. J. Carbohydrate metabolism//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 269.
- Niederpruem D. J., Deunen D. W. Kinetics, nutrition and inhibitor properties of basidiospore germination in *Schizophyllum commune*//Arch. Microbiol. 1966, Vol. 54, N 2. P. 91—105.

- Niederpruem D. J., Hachett D. P. Cytochrome system in *Schizophyllum commune*//Plant Physiology. 1961. Vol. 36, N 1. P. 79.
- Nilsson T. Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi//Material und Organismen. 1974. Vol. 9. P. 173.
- Noguchi S., Shimura G., Kawai M. et al. Properties of partially purified cellulolytic and plant tissue macerating enzymes of *Irpex lacteus* Fr. in special reference to their applications//Agr. Biol. Chem. 1978. Vol. 42. P. 339.
- Norkrans B. Studies of β -glucoside- and cellulose-splitting enzymes from different strains of *Collybia velutipes*//Physiol. Plant. 1957. Vol. 10, N 2. P. 454.
- Okorokov L. A., Sisuev V. A., Kulaev I. S. Pyrophosphate stimulated transport of calcium in the germlings of *Phytophthora infestans*//Europ. J. Biochem. 1978. Vol. 83. P. 507.
- Olive L. S. Nuclear behavior during meiosis//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 43.
- Page R. M. Light and the asexual reproduction of *Pilobolus*//Sciens. 1962. Vol. 138. P. 1238.
- Pan S. S., Nason A. Purification and characterisation of homogenous assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrat reductase//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. Vol. 523. P. 297.
- Peek R. D., Liese W., Parameswaran N. Infektion und Abbau des Wurzelholzes von Fichte durch *Fomes annosus*//Europ. J. of Forest Pathol. 1972. Vol. 2, N 4. P. 237.
- Perlman D. The chemical environment for fungal growth//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 479.
- Rau W. Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. I//Planta. 1967. Vol. 72, N 1. P. 14.
- Reiss J. Cytochemische Lokalisation der Pyridoxol—Dehydrogenase (E. C. I. 1. S) bei *Saccharomyces cerevisiae*//Naturwissenschaften. 1967. Vol. 54, N 2. P. 51.
- Robinow C. F. Observations on cell growth, mitosis and division in the fungus *Basidiobolus ranarum*//J. cell. Biol. 1963. Vol. 17. P. 123.
- Robinow C. F., Bakerspigel A. Somatic nuclein and forms of mitosis in fungi//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 119.
- Rösch R. Über die intracelluläre Polyphenoloxidasen der Braunfäulepilze. IV//Arch. Microbiol. Vol. 54, N 1. P. 80.
- Rösch R., Liese W. Ringschalen Test mit holzerstörenden Pilzen II//Arch. Microbiol. 1971. Vol. 75. P. 140.
- Roschbau W. H. E., Ives D. A. Review of the biochemistry and coagulation physiology of brinolase (fibrinolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*)//VIII. Erfurter Konf. über Hämostase und Thrombose. 1974. Vol. 25; P. 1973. Vol. 22.
- Roth R., Sussman M. Trehalose synthesis in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*//Biochim. Biophys. Acta. 1966. Vol. 122, N 2. P. 225.
- Rotstein A. Uptake and translocation//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 429.
- Sadasivan V. Biochemical studies on *Penicillium chrysogenum* Q—176//Arch. of Biochem. and Biophys. 1952. Vol. 37, N 2. P. 172.
- Sadasivan T. S. Effect of mineral nutrients on soil microorganisms and plant disease//Coll. Ecology of soil borne plant pathogens. Univ. of California press, 1965. P. 460.
- Said H., Harhash A. Comparative study of the effect of nitrate and amino acid nitrogen on the respiration, ketoacid production and nitrogen metabolism of *Fusarium oxysporum*//Acta Biol. et Med. German. 1966. Vol. 17, N 2. P. 135.
- Saraswathi-Devi L. Heavy metal requirements of fungi//Proc. Indian Acad. Sci. 1955. Vol. 41, N 3. P. 145.
- Schneider W. C. Structural factor metabolic regulations//Proc. of III Inter. Congr. Biochem. Brussel, 1955. P. 305.
- Selby K. Mechanism of biodegradation of cellulose//Proc. of I Inter. Biodet. Symp. Southampton, 1968. P. 62.

- Sete H., Yenehara H., Utilisation of ^{13}C — ^{13}C coupling in structural and biosynthetic studies. VIII//Tetrahedron letters. 1977. Vol. 5. P. 487.
- Shah V. K., Brill V. J. Isolation of an iron-molibdenum cofactor from nitroge-
nase//Proc. Nation. Acad. Sci. USA. 1977. Vol. 74. P. 3249.
- Shaw P. D., Hager L. P. Biological chlorination. IV//J. Biol. Chem. 1961.
Vol. 238, N 6. P. 1626.
- Sisler H. D., Tecousbalides M. C. Effect of tricyclazole on melanin pro-
duction and secondary fungal metabolism//Systemic fungicides. V Inter. Symp.
Berlin, 1979. P. 169.
- Sjostrand F. The ultrastructure of mitochondria//Fine structure of cells. New
York—London, 1955. P. 16.
- Solomon A. K. Measurement of the equivalent pore radius in cell membranes//
Membrane transport and metabolism/Ed. by A. Kleinzeller and A. Kotyk.
N. Y. 1961. P. 94.
- Smith J. E., Berry D. R. The filamentous Fungi. Vol. I. London, 1975. 452 p.
- Soprunov F. F. Biochemie der Helminthen. Jena. 1978. P. 75.
- Sörensen H. Microbial decomposition of xylan//Acta. Agric. Scand. Suppl.
1957. Vol. 1. P. 1.
- Stein von Kamienski E. Untersuchungen über die flüchtigen Amine der
Pflanzen. III//Planta. 1958. Vol. 50, N 4. P. 331.
- Steinberg R. A. Relation of accessory substance and amine requirements to the
carbon nutrition of *Aspergillus niger*//Proc. Third. Int. Congr. Microbiol. 1939.
P. 491.
- Steinberg R. A. Growth on synthetic nutrient solutions of some fungi patoge-
nic to tobacco//Amer. J. Botany. 1950. Vol. 37. P. 711.
- Stipanovic R. D., Bell A. A. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahl-*
iae, II//Mycologia. 1977. Vol. 69. P. 164.
- Suga I., Kawai M., Noguchi S. et al. Application of cellulolytic and plant
tissue macerating enzyme of *Irpex lacteus* Fr. as feed additive enzyme//Agr.
Biol. Chem. 1978. Vol. 42. P. 347.
- Surdin-Karjan Y., Cherest H., de Robichon-Szulmajster H.
Relationship between methionyl-Transfer synthesis of methionine enzymes//J.
Bacteriol. 1973. Vol. 103, N 3. P. 1150.
- Taber W. A., Vining L. C. Studies on *Isaria cretaceae*//Canad. J. Microbiol.
1959. Vol. 5. P. 513.
- Tandon R. N., Agarwala R. K. Nutritional studies of three species of
Gloeosporium. I//Proc. Indian Acad. Sci. 1956. Vol. 43, N 1. P. 1.
- Thind K. S., Mandahar C. L. The influence of different sources of nitrogen
on the growth of *Cereospora* sp.//Proc. Nation. Acad. Sci. India. 1965. Vol. 35,
N 3. P. 248.
- Thoa H. K., Sašek V., Budesinsky M. et al. Biological transformation of
3-beta-hydroxy-5-androsten-17-one with mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jaca.
ex Fr.) Kumm.//Coll. Czechosl. Chem. Commun. 1978. Vol. 43. P. 336.
- Töpfer H., Piesche K. Charakterisierung einer alkalischen Protease aus *As-*
pergillus ochraceus//Folia haematologica (DDR). 1974. Vol. 101, N 1. P. 97.
- Trinci A. P., Collinge A. J. Inclusion in the septal pores of damaged hyphae
of *Neurospora crassa* by hexagonal crystals//Protoplasma. 1974. Vol. 80, N 1.
P. 57.
- Turian G., Viswanathan M. A. Factours nucleo-cytoplasmiques et diffe-
renciation sexuelle des *Allomyces* inhibition selectives par les acridines et l'acti-
nomycine D//Patol. et microbiol. 1966. Vol. 29, N 5. P. 705.
- Tweedy B. G., Turner N. The mechanism of sulfur reduction by conidia of
Monilia fruticola//Contr. B. Thompson Inst. 1966. Vol. 23, N 7. P. 255.
- Vaněk Z., Suck M. Factors determining the biosynthesis of griseofulvin and
similar substances//Folia Microbiol. 1962. Vol. 7, N 4. P. 262.
- Venderleyden J., Hanssens L., Verachtert H. Induction of cyani-
deinsensitive respiration of *Moniliella tomentosa* by the use of *n*-propanol//J.
Gener. Microbiol. 1978. Vol. 105, N 1. P. 63.
- Verona O., Lipidi A. A. El metode collettivo nella ricerche dei micromiceti cel-
lulosolitici nel terrano//Agric. Ital. 1966. Vol. 66, N 2. P. 100.

- Vole J., Sedmera P., Musilek V. Glucose-2-oxydase activity and accumulation of D-arabino-2-hexosulose in cultures of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*//Fol. Microbiol. 1978. Vol. 23. P. 292.
- Vole J., Sedmera P., Musilek V. Conversion of monosaccharides into their corresponding 2-glucosuloses by intact cells of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*//Coll. Czechosl. Chem. Commun. 1980. Vol. 45. P. 950.
- Wacker W. E. C., Vallee B. L., Hoch F. L. Inhibition of zincmetallodehydrogenases//IV Inter. Kohgr. Biochemie. 1958. Vol. 12. P. 57.
- Walker G. C., Nicholas D. J. D. Nitrate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*//Biochim., Biophys. Acta. 1961. Vol. 49. P. 350.
- Wang-Sy-Jing C., Le Tourneau D. Trehalose from *Sclerotinia sclerotiorum*//Arch. Microbiol. 1972. Vol. 87, N 3. P. 235.
- Weete J. D. Lipid biochemistry of fungi and other organisms. New York—London, 1980. P. 261.
- Wenger C. J., Lilly V. G. The effects of light on carotinogenesis, growth and sporulation of *Syzygites megalocarpus*//Mycologia. 1966. Vol. 58, N 5. P. 671.
- Wessels J. G. H. Control of cell-wall glucan degradation during development in *Schizophyllum commune*//Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol. 1966. Vol. 32, N 4. P. 341.
- Westermarck U., Eriksson K. E. Cellobiase: quinone oxydoreductase a new wood degrading enzyme from white-rot fungi//Acta. Chem. Scand. 1974. Vol. 28. P. 209.
- Wickenham L. J., Barton K. A. Phylogeny of phosphomannan-producing yeast. I//J. Bakteriol. 1961. Vol. 82, N 2. P. 265.
- Williams C. F., Niederpruem D. J. Trehalase in *Schizophyllum commune*//Arch. Microbiol. 1968. Vol. 60. P. 377.
- Wolf F. F. Nutrition and metabolism of the tobacco wilt *Fusarium*//Bull. Terrey Botan. Club. 1955. Vol. 82, N 5. P. 343.
- Zolokar M. Integration of cellular metabolism//The fungi. Vol. I/Ed. by G. C. Ainsworth and A. S. Sussman. New York—London, 1965. P. 377.
- Zouchová L., Kocourek J., Musilek V. Mannosidase and mannanase of some wood-rotting fungi//Fol. Microbiol. 1977a. Vol. 22. P. 61.
- Zouchová L., Kocourek J., Musilek V. Separation and properties of alpha-mannosidase and mannanase from the basidiomycete *Phellinus abietis*//Fol. Microbiol. 1977. Vol. 22. P. 98.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Об авторе	3
Предисловие автора	5
Принятые сокращения	6
Глава 1. Химический состав мицелия грибов и его специфичность . . .	8
1. Содержание воды и сухих веществ	9
2. Клеточная оболочка грибов	10
3. Полифосфаты и ДНК в клетках грибов	17
4. Антибиотики, токсины грибов и вещества — регуляторы проницаемости	24
5. Запасные вещества грибов	29
6. Минеральные вещества в мицелии грибов	30
7. Специфичность химического состава грибной клетки	31
Глава 2. Минеральное питание грибов	34
Глава 3. Источники углерода в питании грибов и углеродный обмен . .	54
1. Источники углерода и питания грибов	54
2. Общие данные об углеродном обмене грибов	59
3. Основной обмен соединений углерода у грибов	61
4. Боковые ветви обмена углерода	74
Глава 4. Азотное питание грибов. Функция соединений азота в мицелии грибов и их биосинтез	98
1. Азотное питание грибов	98
2. Пути усвоения неорганического азота грибами	102
3. Усвоение органического азота, синтез и использование аминокислот	107
4. Метаболизм и роль мочевины у грибов	111
5. Процессы трансметилирования и образования аминов у грибов	113
Глава 5. Витаминное питание и роль витаминов в обмене грибов . . .	117
1. Общие сведения и потребности грибов в витаминах	117
2. Водорастворимые витамины группы В	120
3. Жирорастворимые витамины	134
Глава 6. Ферменты грибов	144
1. Ферменты фосфорного обмена	146
2. Гидролазы	155
3. Окислительно-восстановительные ферменты и дыхательные цепи грибов	175
Глава 7. Структурное оформление процессов обмена	195
1. Наблюдения на уровне светового микроскопа и методом центрифугирования	195
2. Клеточная мембрана	196
3. Митохондрии (хондриосомы)	198
4. Рибосомы (микросомы)	200
5. Ядро	201
6. Цитоплазма	206
7. Поровые устройства грибов	209
8. Локализация в клеточных органеллах звеньев обмена веществ	213
Литература	215

Научное издание

Беккер Зинаида Эрнестоина

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГРИБОВ

Зав. редакцией *Н. М. Глазкова*
Редактор *Л. И. Метлина*
Художник *И. С. Клейнард*
Художественный редактор *Б. С. Вехтер*
Технический редактор *Н. И. Смирнова*
Корректоры *В. П. Кададинская, Т. С. Милякова*

ИБ № 3036

Сдано в набор 04.12.87.
Подписано в печать 31.10.88.
Л-36890 Формат 60×90/16 Бумага тип. № 1
Гарнитура литературная. Высокая печать.
Усл. печ. л. 14,5 Уч.-изд. л. 15,86 Тираж 2780 экз.
Заказ 261 Изд. № 4946 Цена 2 р. 30 коп.

Ордена «Знак Почета» издательство Московского университе
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.

Типография ордена «Знак Почета» изд-ва МГУ.
119899, Москва, Леиниские горы.

З. Э. БЕККЕР

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ГРИБОВ

